

Akute und subakute Leberalterationen
nach Aflatoxin B₁-Applikation bei der Ratte.

Lichtmikroskopische, elektronen-
mikroskopische und ultrahistochemische
Untersuchungen.

Kurzfassung

von
Bernd Nussinger
aus Weitramsdorf / Coburg

1977
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548420_0083

Akute und subakute Leberalterationen
nach Aflatoxin B₁-Applikation bei der Ratte.

Lichtmikroskopische, elektronen-
mikroskopische und ultrahistochemische
Untersuchungen.

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Bernd Nussinger
aus Weitramsdorf / Coburg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissen-
schaftlichen Fachbereichen der Universität

Erlangen - Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.1977

Vorsitzender der Promotionskommission

Professor Dr. E. Schweizer

Erstberichterstatte Professor Dr. C.G. Arnold

Zweitberichterstatte Professor Dr. V. Becker

Drittberichterstatte Professor Dr. H. Korn



Inhaltsverzeichnis

I. <u>Einleitung</u>	S. 1
II. <u>Material und Methodik</u>	S. 2
1. Methodik	S. 2
1.1. Histologie	S. 2
1.2. Histochemie	S. 3
1.2.1. Histochemie der Sauren Phosphatase	S. 3
1.2.2. Histochemie der Glucose-6-Phosphatase	S. 4
1.3. Elektronenmikroskopie	S. 4
1.4. Ultrahistochemie	S. 5
1.4.1. Ultrahistochemie der Sauren Phosphatase	S. 5
1.4.2. Ultrahistochemie der Glucose-6-Phosphatase	S. 5
III. <u>Ergebnisse</u>	S. 7
1. Nach Aflatoxin B ₁ -Intoxication	S. 7
1.1. Lichtoptische und elektronenoptische Befunde am Portalfeld	S. 7
1.2. Histochemische Ergebnisse	S. 10
1.2.1. Glucose-6-Phosphatase	S. 10
1.2.2. Saure Phosphatase	S. 11
1.3. Elektronenoptische Ergebnisse an den Hepatocyten	S. 12
1.3.1. 6 und 7 Stunden	S. 12
1.3.2. 18 Stunden	S. 14
1.3.3. 24 Stunden	S. 14
1.3.4. 48 und 72 Stunden	S. 15
1.3.5. 96 Stunden	S. 16
1.3.6. 1 und 2 Wochen	S. 16
1.3.7. 3 und 4 Wochen	S. 17
1.3.8. 10 und 12 Wochen	S. 17

1.4. Ultrahistochemische Ergebnisse	S. 18
1.4.1. 7 bis 48 Stunden	S. 18
1.4.2. 48 bis 96 Stunden	S. 19
1.4.3. 2 Wochen	S. 19
1.4.4. 3 bis 4 Wochen	S. 19
1.4.5. 10 und 12 Wochen	S. 20
IV. <u>Zusammenfassung der Diskussion</u>	S. 22
V. <u>Anhang</u>	S. a1

I. Einleitung

Wenige Untersuchungen haben sich bisher mit der Darstellung enzymhistochemischer Veränderungen in Verbindung mit signifikanten Veränderungen der Zellfeinstruktur nach einmaliger Applikation hepatocarcinogener Stoffe befaßt. Eine vergleichende Betrachtung der enzymhistochemischen und morphologischen Ergebnisse schien deshalb wichtig, da sich spezifische Strukturveränderungen einer Zelle in der toxischen Phase mit höherer Wahrscheinlichkeit dann zu erkennen geben, wenn sie mit Alterationen von Enzymaktivitäten der betroffenen Zellorganellen einhergehen.

Die Untersuchungen wurden mit Aflatoxin B₁ durchgeführt, einem Stoffwechselendprodukt des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, das für viele Tierarten eine stark hepatotoxische und hepatocarcinogene Substanz ist.

Die Arbeit setzte sich folgende Ziele:

1. Die akuten und subakuten Veränderungen im Lebergewebe der Ratte nach einmaliger Aflatoxin B₁-Applikation sollten über einen Zeitraum von 7 Stunden bis 12 Wochen lichtmikroskopisch, elektronenmikroskopisch und ultrahistochemisch untersucht und verglichen werden.
2. Die Ergebnisse sollten mit bisher bekannten ultrastrukturellen und histochemischen Veränderungen von Tumorgeweben, sowie mit den Ergebnissen anderer hepatocarcinogener Noxen verglichen werden.

II. Material und Methodik

1. Methodik

Zur Untersuchung gelangten 66 männliche Sprague-dawley Ratten (Durchschnittsgewicht 100 - 200 g), die unter konventionellen Bedingungen bei 22 - 24°C in Makrolonkäfigen gehalten wurden und Altromin-standardfutter sowie Wasser ad libitum erhielten.

50 Ratten wurde eine einmalige Dosis von 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁ peroral durch eine Magensonde instilliert (LD₅₀ : 7 mg/kg Körpergewicht).

Das kristalline Toxin (Fa. MACOR, Israel) wurde in Dimethylformamid (DMF) gelöst, und zwar 10 mg Aflatoxin B₁ in 1 ml DMF.

16 Ratten wurde zur Kontrolle Wasser bzw. DMF-Lösung instilliert.

Jeweils 3-4 Ratten wurden nach 7, 18, 24, 48, 72, 96 Stunden getötet.

Die perfusionsfixation wurde mit 2,5% Glutaraldehyd, gepuffert in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2 - 7,4) bei einem Osmol-Gehalt von 350 - 400 mOsm, 10 -15 min durchgeführt.

Das Lebergewebe, dem linken Leberlappen entnommen, wurde licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Saure Phosphatase als lysosomales Enzym und Glucose-6-Phosphatase als mikrosomales Enzym wurden histochemisch und ultrahistochemisch untersucht.

1.1. Histologie

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde das Lebergewebe in 4% Formaldehyd fixiert.

Die Einbettung erfolgte in Paraplast. Die Mikrotomschnitte wurden der HE-Färbung, PAS-Reaktion mit Alcian-Blau unterzogen.

Lichtmikroskopie - Semidünnschnittmethode.

Das fixierte Gewebe wurde nach dem Waschvorgang mit 2% OsO_4 -Lösung in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2 - 7,4) 30 min postfixiert. Die Dehydratation erfolgte in aufsteigender Acetonreihe, die Einbettung der Schnitte in Durcupan ACM. Die Polymerisationszeit betrug 3 Tage, die Polymerisationstemperatur 60°C .

Es wurden ca. 1 μm dicke Schnitte (Semidünnschnitte) mit dem Ultramikrotom, Fa. REICHERT, Wien, angefertigt.

Die Schnitte wurden 30 min lang mit 0,1% Toluidinblau in 2,5% NaHCO_3 -Lösung (pH 11) überschichtet. Nach gründlicher Spülung erfolgte die Einbettung in Xylol.

1.2. Histochemie

Das in 2,5% GA fixierte Gewebe (Perfusionsfixation mit 2,5% GA in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 mit Saccharosezusatz) wurde in Stickstoff tiefgefroren. Von diesem Gewebe wurden mit dem Kryostat-Mikrotom Serienschnitte von 20 - 30 μm Dicke angefertigt.

1.2.1. Histochemie der Sauren Phosphatase

Für die Demonstration der sauren Phosphatase wurden die Kryostatschnitte in einem modifizierten Gomori (1950) Inkubationsmedium 30 min bei 37°C inkubiert (Inkubationsgemisch: 50 ml

Acetatpuffer pH 5,4 - 5,6, 5 ml 3% Na- β -Glycerophosphat und 0,6 g Pb (NO₃)₂). Die Schnitte wurden anschließend kurzzeitig in dest. Wasser und 2% Essigsäure gespült. Sodann wurden die Schnitte in eine Ammonium-sulfidlösung gegeben.

1.2.2. Histochemie der Glucose-6-Phosphatase

Für die Darstellung der Glucose-6-Phosphatase wurden die Kryostatschnitte in einem Inkubationsgemisch 15 min bei 32°C inkubiert (Inkubationsgemisch: 25 mg Glucose-6-Phosphat-Na-Salz, 27 ml dest. Wasser, 3 ml 2% Pb (NO₃)₂, 20 ml 0,2 M Tris-Maleatpuffer pH 6,7).

Die histochemischen Kontrollversuche für die Glucose-6-Phosphatase wurden mit Na- β -glycerophosphat durchgeführt; für die Saure Phosphatase wurden 0,1 M NaF verwendet.

1.3. Elektronenmikroskopie

Das fixierte Lebergewebe (Perfusionsfixation mit 2,5% GA in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 - 7,4 mit Saccharosezusatz) wurde in Pufferlösung gespült und anschließend 2 Stunden in 2% OsO₄ (+ 0,1 M Cacodylatpuffer) bei 0 - 4 °C postfixiert. Die Dehydration erfolgte in aufsteigender Acetonreihe, die Einbettung in Durcupan ACM. Die in feste Polymeren eingebetteten Blöcke wurden mit dem Reichert-Ultramikrotom (OM - U/2) 60 - 90 μ m dünn geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die elektronenoptischen Untersuchungen wurden mit dem Elektronenmikroskop Elmiskop I

der Fa. SIEMENS durchgeführt.

1.4. Ultrahistochemie

Für die ultrahistochemischen Darstellungen der Sauren Phosphatase und der Glucose-6-Phosphatase wurde das Gewebe wie beschrieben vorbehandelt.

1.4.1. Ultrahistochemie der Sauren Phosphatase nach den Methoden von GOMORI (1950) und ERICSSON and TRUMP (1964)

Die ~80 μ m dicken Schnitte wurden in einem Inkubationsgemisch mit DMSO-Zusatz 30 min bei 37°C inkubiert (Inkubationsgemisch: 50 ml Acetatpuffer pH 5,4 - 5,6; 5 ml 3% Na- β -glycerophosphat und 0,6 g Pb (NO₃)₂). Die inkubierten Schnitte wurden anschließend 2 min in 2% Essigsäure mit Saccharosezusatz gespült. Die Postfixation erfolgte mit 2%-iger OsO₄ (+ 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,4) 30 min. Die Schnitte wurden in aufsteigender Acetonreihe dehydriert. Kontrollversuche wurden mit 0,1 M NaF durchgeführt.

1.4.2. Ultrahistochemie der Glucose-6-Phosphatase nach den Methoden von WACHSTEIN und MEISEL (1957), LAZARUS und BARDEN (1964) und HUGON et al. (1970).

Die ultrahistochemische Methode unterschied sich von der für die saure Phosphatase in der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: 50 mg Glucose-6-Phosphat-Na-Salz, 27 ml dest. Wasser, 3 ml 2% Pb (NO₃)₂ und 20 ml Tris-

maleatpuffer pH 6,7 mit 8 ml Saccharose).
Die Ultradünnschnitte blieben in der Regel
unkontrastiert.

Die Kontrollversuche wurden mit Na- β -glyce-
rophosphat durchgeführt.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen
wurde das Elektronenmikroskop der Fa. SIEMENS
verwendet.

III. Ergebnisse

Kontrollen

Das Lebergewebe der Kontrolltiere wurde lichtmikroskopisch, elektronenmikroskopisch und ultrahistochemisch untersucht. Die Befunde sind normal (Abb. 1, 2, S. a1, a2).

1. Nach Aflatoxin B₁ Intoxication

1.1. Lichtoptische und elektronenoptische Befunde am Portalfeld

24 Stunden nach einmaliger Applikation des Hepatocarcinogens Aflatoxin B₁ traten einzelne, nach 48 und 72 Stunden ausgedehnte Nekrosen der periportal gelegenen Hepatocyten auf (Abb. 3, S. a3). Diese acinoperiphere Parenchymnekrose war nach 72 Stunden von einer Proliferation der Gallengangsepithelien begleitet (Abb. 4, S. a3). Nekrotische Veränderungen konnten vereinzelt auch in zentrolobulären Hepatocyten beobachtet werden. Die Portalfelder erscheinen allgemein verbreitert, die interlobulären Gallengänge häufig geschlängelt. Daneben konnten vermehrt Mitosen in den Gallengangsepithelien beobachtet werden. Zwischen 96 Stunden und 21 Tagen waren ausgeprägte Wucherungen der interlobulären Gallengänge und vor allem Wucherungen der Ductuli zu sehen (Abb. 5, S. a3). Vor allem werden die Leberzellplatten im Portalbereich von Gallengangsproliferaten umgeben. Diese Proliferationen begannen mit der Zunahme sog. "Ovalzellen" unter gleichzeitiger radiärer Infiltration dieser Zellen zwischen den Leberzellplatten in der Umgebung des Portalfeldes (Abb. 6, S. a3).

Nach 14 Tagen durchsetzen die Ovalzellen den gesamten Leberlobulus. Sie sind um die polygonalen Hepatocyten herum angeordnet und auch zwischen denselben zu finden (Abb. 7, S. a4). 14 Tage nach Aflatoxin B₁-Applikation finden sich proliferierte Ductuli bis nahe der Zentralvene (Abb. 8, S. a4).

Die Gallengangsepithelzellen sind durch ihre ultrastrukturellen Merkmale immer deutlich von den Hepatocyten zu unterscheiden. Diese Unterscheidung kann auch bei den durch Aflatoxin B₁ induzierten Proliferationen der Gallengänge vorgenommen werden (Abb. 9, S. a4).

Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten die feinstrukturelle Ähnlichkeit der Ovalzellen mit den Gallengangsepithelzellen (Abb. 10, S. a5): Ihre Form ist plattlänglich statt kubisch oder prismatisch.

Weiter ist zu erkennen, daß sie in engem Kontakt mit den Hepatocyten liegen und durch Desmosomen und Verzahnungen von Cytoplasmaausstülpungen verbunden sind.

An verschiedenen Abschnitten wurden eine ganze Reihe neuproliferierter Gallengangsepithelzellen als einreihige Zellplatte an Hepatocyten beobachtet (Abb. 11, S. a6). Kleine Lumina werden auch hier von den Gallengangsepithelzellen und den Hepatocyten gebildet. Im Cytoplasma der von den Gallengangsepithelzellen neu gebildeten Zwischenstücke sind im Gegensatz zum Cytoplasma benachbarter Hepatocyten nur wenige Lysosomen vorhanden. Die Lumina der Zwischenstücke

und der Gallenductuli zeigen bereits nach einer Woche häufig aufgetriebene Mikrovilli von Hepatocyten bzw. Gallengangsepithelzellen (Abb. 12, S. a6).

Die Epithelzellen der Gallengangsproliferate sind durch eine Basalmembran vom umliegenden Mesenchym gut abgegrenzt. Nicht selten treten Verdoppelungen der Basalmembran auf (Abb. 13, S. a7).

Nach 21 Tagen sind die Wucherungen der interlobulären Gallengänge stark ausgeprägt. Die proliferierten Gallengangsepithelzellen, die mit benachbarten Hepatocyten kleine Lumina bilden, zeigen weiter aufgetriebene Mikrovilli. Größere Gallengangsepithelzellen zeigen große Zellkerne mit ausgeprägten Nucleoli (Abb. 14, S. a7, Abb. 15, S. a8).

Mit der Proliferation der Gallengänge nimmt nun die Zahl der Mesenchymzellen zu. Nach 3 Wochen treten herdförmig Cholangiofibrosen auf. Die Proliferation der biliären Epithelzellen persistierte bis zu 4 Wochen nach einmaliger Applikation von Aflatoxin B₁. Nach 4 Wochen sind fast die gesamten Leberlobuli mit Gallengangsproliferaten durchsetzt (Abb. 16, S. a9). Hepatocyten mit pathologischen Mitosen werden häufiger beobachtet (Abb. 17, S. a9).

In den proliferierenden Gallengängen sind daneben mehrere Zellen zu sehen, deren Cytoplasma sich nach einer PAS-Reaktion stark rötlich färbt. Diese Zellen vermögen ähnlich den Becherzellen Mucopolysaccharide zu speichern. Einige

dieser Zellen sezernieren ihren PAS-positiven cytoplasmatischen Inhalt in die Lichtung der proliferierten Gallengänge (Abb. 18, S. a10). Den PAS-positiven Schleimsubstanzen in der Lichtmikroskopie entsprechen im elektronenmikroskopischen Bild die im Cytoplasma der Gallengangsproliferate zu beobachtenden stark osmiophilen Granulaanhäufungen (Abb. 19, S. a10). Deutlich können diese mucopolysaccharidspeichernen Zellen nach 8 und 9 Wochen beobachtet werden. Nach 10, 11 und 12 Wochen sind solche Zellen noch häufiger zu finden (Abb. 20, S. a10). Bei den Kontrolltieren wurden diese PAS-positiven Zellen nicht beobachtet. Eine cystische Transformation der Gallengangsproliferate und eine Umwandlung im Sinne einer Cirrhose konnte bei den vorliegenden Untersuchungen nach einmaliger Aflatoxin B₁-Gabe nicht beobachtet werden.

1.2. Histochemische Ergebnisse

1.2.1. Glucose-6-Phosphatase

Kontrollen

In der normalen Leber zeigten die Hepatocyten eine beinahe gleichmäßig durch das Lebergewebe verteilte Glucose-6-Phosphatase-Aktivität (Abb. 21, S. a11).

Innerhalb des Leberlobulus ist die Aktivität des Enzyms im zentrolobulären Bereich schwächer als in der Peripherie.

Aflatoxin B₁ induzierte Veränderungen

Die nekrotischen Veränderungen waren in der akuten Phase von einer deutlichen Verminde-

rung der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase begleitet (Abb. 22, S. a11).

Die Enzymaktivität ist auf das Cytoplasma der Hepatocyten begrenzt. In den periportalen Bereichen erscheint die Verminderung der Enzymaktivität ausgeprägter als in zentrolobulären Bereichen (Abb. 23, S. a11).

Nach 2 Wochen glich die Verteilung der Enzymaktivität wieder der in den Kontrolltieren. Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase ist gut nachweisbar. Auch nach 10 und 12 Wochen ist histochemisch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen festzustellen.

Mit der PAS-Reaktion konnten auch Veränderungen im Gehalt an Glycogengranula festgestellt werden. Es konnte beobachtet werden, daß die Veränderungen mit Veränderungen der Enzymaktivität an Glucose-6-Phosphatase einhergehen. Während der akuten Versuchsreihe wurde ein verminderter Glycogengehalt festgestellt. Die Verminderung persistierte bis 72 Stunden nach einmaliger Gabe von Aflatoxin B₁.

Nach 2 und 4 Wochen ist wieder eine PAS-positive Reaktion zu erkennen.

Auch nach 10 und 12 Wochen ist Glycogen wieder reichlich vorhanden.

1.2.2. Saure Phosphatase

Kontrollen

In den Leberparenchymzellen der Kontrolltiere ist die Saure Phosphatase pericaniculär in spezifischen cytoplasmatischen Partikeln

lokalisiert. Auch in den Kupffer'Sternzellen kann das Enzym nachgewiesen werden (Abb.24,25, S. a12).

Aflatoxin B₁ induzierte Veränderungen

Die morphologischen Veränderungen im periportalen Bereich waren begleitet von einer leicht vermehrten wie teilweise diffusen Verteilung der Enzymaktivität im peribiliären Bereich (Abb. 26, S. a12).

Nach 4 Wochen konnte in vielen Hepatocyten eine deutlich verstärkte Reaktion der Sauren Phosphatase beobachtet werden (Abb. 27, S.a12). Auch nach 10 und 12 Wochen ist die Reaktion sichtbar.

1.3. Elektronenoptische Ergebnisse an den Hepatocyten

Aflatoxin B₁ induzierte Veränderungen

1.3.1. 6 und 7 Stunden

6 Stunden nach Aflatoxin B₁-Applikation treten in den Hepatocyten des periportalen Bereiches Verdichtungen der nucleolären Strukturen auf (Abb. 28, S. a13). Gleichzeitig kann eine Segregation der fibrillären und granulären Anteile der Nucleoli beobachtet werden. Diese persistiert, so daß nach 72 Stunden in fast allen Hepatocyten eine deutliche elektronendichte, sog. "Nucleolenkappenbildung" (nuclear caps) zu sehen ist (Abb. 29, S. a13).

Die Nucleoli sind im allgemeinen von runder und kompakter Gestalt. Im übrigen war die

Dichte der Interchromatinsubstanz in Nucleoli mit Kappenbildung deutlich vermindert.

Die Nucleoli der Hepatocyten zeigen zudem verschiedene Segregationsgrade.

In der zentrolobulären Zone sind die Zellkerne regelmäßig konturiert, die Nucleoli jedoch häufig von abnormer Struktur.

Die Veränderungen im Cytoplasma der periportal gelegenen Hepatocyten sind ausgeprägter als im zentrolobulären Bereich. Das granuläre ER zeigt in der Hauptsache gebundene Ribosomen; daneben sind vereinzelt auch freie ribosomale Rosetten zu beobachten.

Eine zu diesem Zeitpunkt bestehende irreguläre Vesikelbildung des ER konnte nur in wenigen Hepatocyten festgestellt werden.

Eine vollständige Auflösung der vordem parallel angeordneten Membranstrukturen des granulären ER unter Bildung irregulärer Vesikel konnte in dem gesamten Untersuchungszeitraum nicht beobachtet werden.

Die Proliferation des agranulären ER persistiert in Verbindung mit einer deutlichen Zurückdrängung und Verminderung von Glycogengranula (Abb. 30, S. a14).

Die Golgi-Apparate erscheinen zum Teil hypertrophiert; dagegen sind die Gallenkapillaren unverändert. Es wird eine leichte Vermehrung der pericaniculär gelegenen Lysosomen festgestellt (Abb. 31, S. a14). Auch sind autophagische Vakuolen zu erkennen, die cytoplasmatische Zelltrümmer enthalten.

1.3.2. 18 Stunden

Die Leberparenchymzellen der Periportalzone zeigen beträchtliche Unregelmäßigkeiten. Die Zellkerne vieler Hepatocyten besitzen dichte, z.T. irreguläre Nucleoli mit Verdichtungen und Kappenbildungen. Die Kernmembran erscheint glatt mit unwesentlicher Invagination (Abb. 32, S. a15).

Das Cytoplasma zeigt deutliche morphologische Veränderungen. Große autophagische Vakuolen sind sichtbar (Abb. 33, S. a15).

Häufiger erscheinen freie Ribosomen als Folge eines Loslösungsprozesses von den Membranen: des granulären ER. Das agranuläre ER ist deutlich proliferiert. Mit der Proliferation ist eine auffallende Abnahme des Glycogengehaltes verbunden. Dieser Glycogenschwund ist in allen untersuchten Hepatocyten zu beobachten.

Die Mitochondrien sind teilweise hypertrophiert. Die Hepatocyten der zentrolobulären Zone zeigen dagegen keine wesentlichen Veränderungen.

1.3.3. 24 Stunden

24 Stunden nach einmaliger Aflatoxin B₁-Applikation treten einzelne ausgedehnte Nekrosen der periportal gelegenen Hepatocyten auf. Die Verdichtung des nucleolären Materials persistiert.

Die im Lichtmikroskop erkennbaren Aufhellungen im Cytoplasma erweisen sich nun als ausgeprägte Proliferationen des agranulären ER,

mit deutlicher Verminderung des Glycogengehaltes (Abb. 34, S. a16).

Die Mitochondrien sind häufiger hypertrophiert. Der Golgi-Apparat zeigt eine deutliche Dilatation seiner Cisternen. Die lysosomale Struktur ist unverändert; hingegen scheint die Zahl der Lysosomen gegenüber 7 bzw. 18 Stunden leicht vermehrt. Die Gallenkapillaren zeigen eine Mikrovilliabflachung und Zottenschwellung (Abb. 35, S. a16).

Fettvakuolen mit translokulentem Material und dunkler Matrix sind weiterhin zu beobachten.

1.3.4. 48 und 72 Stunden

In fast allen Hepatocyten der Periportalzone zeigen die Nucleoli eine deutliche Segregation der fibrillären und granulären Anteile. Im Cytoplasma persistiert die ausgeprägte Proliferation des agranulären ER in Verbindung mit dem Fehlen von Glycogen.

Nach 72 Stunden sind die Cisternen des Golgi-Apparates stark dilatiert (Abb. 36, S. a17). Neben einer partikulär vermehrten Zahl an Lysosomen sind auch vermehrt Autophagosomen zu sehen (Abb. 37, S. a17).

Die Mitochondrien zeigen besonders nach 72 Stunden bizarre Strukturformen mit cristae-armen Elementen und erweiterten Cristaeräumen; zum Teil sind stark osmiophile Granula zu erkennen (Abb. 38, S. a18). Es werden vereinzelt auch ringförmige Mitochondrien mit kleinen, im Inneren des Ringes eingeschlossenen Mitochondrien beobachtet (Abb. 39, S. a18). Fettvakuolen sind überall diffus im Cytoplasma verteilt.

1.3.5. 96 Stunden

Die Zellkerne der Hepatocyten erscheinen rund, ihre Nucleoli zeigen nur noch vereinzelt Verdichtungen. Die Veränderungen beginnen sich zu normalisieren.

Hingegen erfährt das agranuläre ER eine zunehmende Ausbildung. Teilweise ist es peripher komprimiert, teilweise wird auch eine Arealbildung erreicht.

Die Mitochondrien sind in der Mehrzahl weiterhin augenfällig vergrößert, was meist mit einer Reduzierung der Matrixdichte und der Cristae einhergeht.

Die Zahl der Lysosomen scheint gegenüber 72 Stunden nur unwesentlich vermehrt zu sein (Abb. 40, S. a19).

1.3.6. 1 und 2 Wochen

Die Zellkerne und die Nucleoli der Hepatocyten sind unverändert (Abb. 41, S. a19).

Im Cytoplasma werden weiterhin deutliche Proliferationen des agranulären ER beobachtet, sowie Dilatationen und Vermehrung der Golgi-Apparate (Abb. 42, S. a20).

Es werden wieder Glycogengranula zwischen den tubulären Elementen des agranulären ER sichtbar.

Nach 2 Wochen gleicht die Verteilung an Glycogen nahezu der in den Kontrolltieren. Glycogen stellt sich z.T. in kleinen, kompakten Arealen oder diffus verteilt zwischen den tubulären Strukturen des agranulären ER dar (Abb. 43, S. a20).

1.3.7. 3 und 4 Wochen

Die Hepatocyten zeigen weiterhin ausgeprägte Proliferationen des agranulären ER sowie eine deutliche Dilatation der Golgi-Cisternen (Abb. 44, 45, S. a21).

Im Cytoplasma vieler Hepatocyten sind nun häufig kompakte Massen an Glycogen neben Glycogenarealen im ER-Bereich zu sehen; der Glycogengehalt erfährt in einigen Hepatocyten eine Komprimierung in der Nähe großer Fettvakuolen (Abb. 46, S. a22).

Vermehrte Lysosomen und Autophagosomen werden in den Hepatocyten beobachtet.

1.3.8. 10 und 12 Wochen

Die Veränderungen in den Hepatocyten haben sich nach 10 und 12 Wochen meist wieder normalisiert. Die Zellkerne sind normal, häufig finden sich Doppelnucleoli.

Das granuläre ER ist meist wieder in parallelen Reihen angeordnet. Es ist eine segmentale Dilatation des granulären ER noch zu erkennen.

Die Ribosomen sind membrangebunden. Eine Regeneration des agranulären ER wird beobachtet.

Glycogengranula sind reichlich vorhanden, jedoch kommt es nicht zu einer ausgeprägten Glycogenspeicherung.

Die Lysosomen sind in den meisten Hepatocyten nicht mehr vermehrt.

1.4. Ultrahistochemische Ergebnisse

Kontrollen

In den Kontrollen ist die Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Periportalzone deutlicher als im zentrolobulären Bereich. Die Enzymaktivität ist allgemein am Membransystem des granulären ER lokalisiert; weiterhin kann eine Lokalisation an der äußeren Kernmembran des Hepatocyten sowie der Kupffer'Sternzellen beobachtet werden (Abb. 47, S. a22, Abb. 48, S. a23).

Es wird kein Reaktionsprodukt an den Mitochondrien, den Lysosomen oder der Plasmamembran beobachtet. Eine deutliche Lokalisation der Sauren Phosphatase ist in den Lysosomen nahe der Gallenkapillaren zu erkennen (Abb. 49, S. a23).

Aflatoxin B₁ induzierte Veränderungen

1.4.1. 7 bis 48 Stunden

Glucose-6-Phosphatase

In Verbindung mit der Proliferation des agranulären ER und der Abnahme des Glycogengehaltes ist eine verminderte Glucose-6-Phosphatase-Reaktion vor allem im periportalen Bereich zu erkennen (Abb. 50 - 53, S. a24/a25).

Saure Phosphatase

Die Enzymaktivität scheint in manchen Hepatocyten leicht vermehrt.

1.4.2. 48 bis 96 Stunden

Glucose-6-Phosphatase

Die Alterationen am agranulären ER werden weitgehend begleitet von einer verminderten Nachweisreaktion des Enzyms (Abb. 54, S. a26).

Saure Phosphatase

Nach 96 Stunden kann eine gesteigerte Enzymaktivität in den Lysosomen festgestellt werden (Abb. 55, S. a26).

1.4.3. 2 Wochen

Glucose-6-Phosphatase

Nach 14 Tagen gleicht die Verteilung der Enzymaktivität nahezu der in den Kontrolltieren.

Die Enzymaktivität ist sowohl im granulären als auch im agranulären ER und an der äußeren Kernmembran sichtbar (Abb. 56, 57, S. a27).

Saure Phosphatase

Die Nachweisreaktion im peribiliären Bereich ist gegenüber den Kontrolltieren vermehrt (Abb. 58, S. a28).

1.4.4. 3 bis 4 Wochen

Glucose-6-Phosphatase

Nach 4 Wochen kann eine deutliche Zunahme der Enzymaktivität sowohl im ER-Bereich als auch im perinucleären Bereich festgestellt werden (Abb. 59, S. a28, Abb. 60, S. a29).

Diese gesteigerte Aktivität wird von einer deutlichen Vermehrung von Glycogengranula, zusammen mit Proliferationen des agranulären ER begleitet.

Saure Phosphatase

Die Enzymaktivität scheint unverändert; eine vermehrte Lysosomenzahl läßt sich nicht eindeutig feststellen. Zuweilen differieren Größe und Form der Lysosomen.

1.4.5.10 und 12 Wochen

Glucose-6-Phosphatase

In fast allen Hepatocyten ist die Glucose-6-Phosphatase-Reaktion wieder deutlich nachweisbar (Abb. 61, S. a29).

Die Reaktion kann an den Membransystemen des granulären ER sowie an der äußeren Kernmembran beobachtet werden.

Saure Phosphatase

Eine verstärkte Nachweisreaktion des partikulär gebundenen Enzyms wird nicht beobachtet.

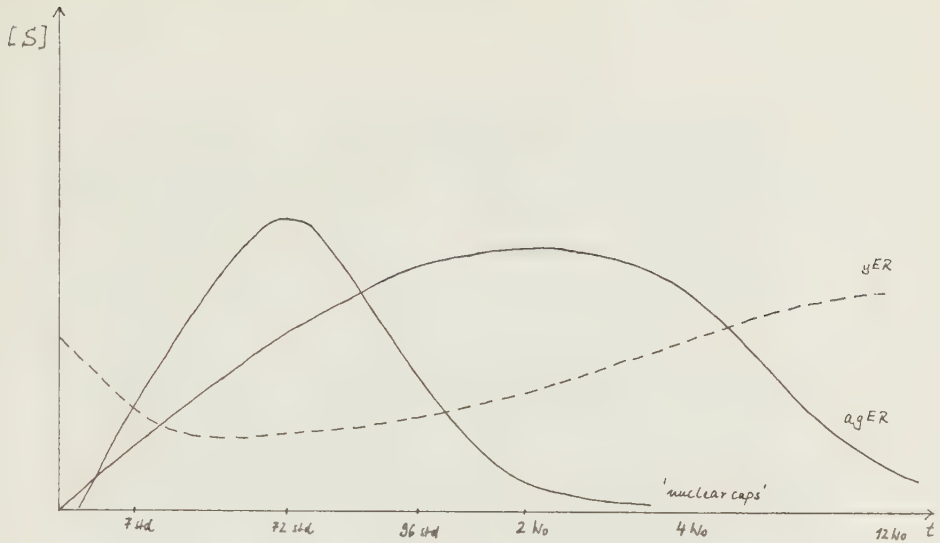


Abb. 62: Qualitativ erfaßte morphologische Veränderungen nach Aflatoxin B_1 -Applikation (Schema)



Abb. 63: Schematischer zeitlicher Verlauf der Enzymaktivitätsänderungen nach Aflatoxin B_1 -Applikation

IV. Zusammenfassung der Diskussion

Die Aflatoxine, Stoffwechselendprodukte verschiedener *Aspergillus flavus* Arten, sind für viele Tierarten stark hepatotoxisch bzw. hepatocarcinogen.

Die akuten und subakuten Veränderungen in der Leber wurden an insgesamt 50 männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach einmaliger peroraler Gabe von 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁ über einen Zeitraum von 6 Stunden bis zu 12 Wochen licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Über den gleichen Zeitraum wurden mit dem lysosomalen Enzym Saure Phosphatase und dem mikrosomalen Enzym Glucose-6-Phosphatase histochemische und ultrahistochemische Untersuchungen am gleichen Objekt durchgeführt.

Die frühesten Veränderungen nach einmaliger Aflatoxin B₁-Applikation treten im nucleären Bereich der periportal gelegenen Hepatocyten auf. Dagegen zeigen die Hepatocyten der zentrolobulären Zone keine wesentlichen Veränderungen. Elektronenmikroskopisch werden Segregationen der fibrillären und granulären Anteile der Nucleoli (sog. "Nucleolarkappen") beobachtet. Die Alterationen haben sich nach 2 Wochen normalisiert. Die nucleoläre Segregation gilt als charakteristisches Frühmerkmal nach Aflatoxin B₁-Einwirkung, wenn auch die Möglichkeit der direkten Wirkung toxischer Metaboliten nicht ausgeschlossen werden kann, da nämlich 80 - 90% des von der Zelle aufgenommenen Toxins innerhalb von 24 Stunden nach Applikation wieder ausgeschieden werden. Die Segregation ist das sichtbare Ergebnis einer Interaktion des Toxins bzw. seiner Stoffmetaboliten mit der DNA des Zellkerns.

Diese rufen wahrscheinlich durch reversible Hemmung Alterationen in der DNA-abhängigen m-RNA-Synthese hervor, indem in einer direkten Interaktion mit dem DNA-Molekül Transcriptionsprozesse durch Hemmung der RNA-polymerase-Aktivität vorübergehend blockiert werden. Die DNA-abhängige RNA-Synthese wird somit kurzzeitig gehemmt. Dadurch wird auch die Synthese bestimmter Leberproteine blockiert.

Signifikante Veränderungen werden auch am tubulären System des agranulären ER beobachtet. Die Proliferation des agranulären ER kann allgemein als eine Anpassungsreaktion der Zelle auf das Toxin verstanden werden. Die nach 24 bzw. 48 Stunden bereits prominente Proliferation wird von einer deutlichen Verminderung von Glycogengranula begleitet. Erst nach 3 Wochen sind im Cytoplasma der Hepatocyten wieder Glycogenareale zu finden.

Daneben werden in vielen Hepatocyten mitochondriale Strukturabnormitäten, Degranulationsprozesse der Ribosomen des granulären ER sowie hypertrophische Erscheinungen am Golgi-Komplex festgestellt. Diese Veränderungen persistieren auch in der subakuten Phase. Für die zu beobachtenden Degranulationsprozesse am ER sind wahrscheinlich die Reduktion des m-RNA-Gehaltes und die temporäre Inhibition der Synthese bestimmter Leberproteine verantwortlich. Möglich ist auch eine Initialschädigung der Ribosomen durch das Toxin. Die elektronenoptischen Ergebnisse geben jedoch allgemein keinen eindeutigen Aufschluß darüber, ob die augenscheinliche Vermehrung des agranulären ER eine aktuelle Synthese neuer Membra-

nen darstellt oder ob durch Anhäufung in mehr kompakten Massen, vor allem in Zellen mit starkem Glycogenschwund, die agranulären Bereiche deutlicher sichtbar werden. Die beobachtete enge topographische Beziehung von Glycogen zu den Membransystemen des agranulären ER deutet auf eine funktionelle Korrelation hin. Die Abnahme des Glycogengehaltes und die Proliferation des agranulären ER scheinen das zu bestätigen. Möglicherweise spielt das Membransystem bei glycogenetischen Vorgängen im zellulären Kohlenhydrat-Metabolismus eine Rolle.

Nach 12 Wochen haben sich die Veränderungen in den Hepatocyten meist wieder normalisiert, und es werden Regenerationsprozesse am agranulären ER beobachtet.

Die akute Wirkung des Toxins bzw. seiner Stoffmetaboliten wird an den ultrahistochemischen Ergebnissen der Enzymaktivitäten der Glucose-6-Phosphatase und der Sauren Phosphatase deutlich. In der akuten Phase der Untersuchung sind die Glucose-6-Phosphatase-Reaktion sowie der Glycogengehalt vermindert. Diese Alterationen werden durch Aflatoxin B₁ bzw. seine Metaboliten hervorgerufen, die wahrscheinlich bestimmte enzymatische Prozesse temporär blockieren. Der in der akuten Phase zu beobachtende Glycogenschwund kann durch Inhibition bestimmter Enzymkomplexe ausgelöst worden sein, aber auch das Ergebnis einer verstärkten Nutzbarkeit der Kohlenhydratreserven durch die Zelle darstellen, die als Reaktion auf veränderte Zellbedingungen dadurch die erforderliche Energie für die Regeneration von Membransystemen bereitstellt.

Das lysosomale Enzym Saure Phosphatase reagiert ebenfalls auf die akute Toxizität des Hepatocarcinogens. Im Gegensatz zu der temporären inhibitorischen Wirkung des Toxins auf die Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphatase in der akuten Phase tritt bei der Sauren Phosphatase neben einer vermehrten Anzahl an Lysosomen bzw. Autophagosomen auch eine verstärkte Enzymreaktion auf. Diese steht in funktioneller Beziehung zur Dilatation der Golgi-Cisternen. Die Struktur der lysosomalen Membran bleibt im wesentlichen unverändert. Die zu beobachtende gesteigerte Autophagie ist aber keineswegs immer ein Indiz für eine massive Zellschädigung. Sie stellt wohl eher eine Anpassungsreaktion der Zelle dar, bei der es allgemein darauf ankommt, den Bestand an funktionstragenden Strukturen in der Zelle zu reduzieren.

Die reaktive Proliferation der Gallengänge, die lichtmikroskopisch 48 und 72 Stunden nach einmaliger Aflatoxin B₁-Gabe im Gefolge ausgedehnter Nekrosen der periportal gelegenen Hepatocyten beobachtet wird, beginnt immer mit einer Zunahme sog. "Ovalzellen" unter gleichzeitiger radiärer Infiltration dieser Zellen zwischen den Leberzellplatten in der Umgebung des Periportalfeldes. Die Ovalzellen weisen charakteristische Merkmale ähnlich denen von Gallengangszellen auf. Die Rolle der Ovalzellen-Proliferation liegt wahrscheinlich darin, daß diese Zellen zur Restauration der Leberschädigung dienen. In der Umgebung des Periportalfeldes bestimmen die periportal Nekrosen an der Grenzlamelle die reaktive Proliferation der Gallengangsepithelzellen. Die Proliferation ist nach

21 Tagen stark ausgeprägt. Vermutlich führen die Insuffizienz im Metabolismus vieler Hepatocyten sowie die anhaltende veränderte chemische Zusammensetzung der Gallensäuren dazu, Gallengangsproliferationen bis zu 21 Tagen nach einmaliger Aflatoxin B₁-Gabe zu erzeugen. In der subakuten Phase wird in diesen Zellen, und nur bei hepatocarcinogenen Stoffen, häufig eine Bildung und Speicherung von sauren Mucopolysacchariden beobachtet. Durch die Mucopolysaccharidosebildung treten später Gallengangszysten auf. Ihre Entwicklung in ein schleimbildendes Gallengangscarcinom konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Cholangiofibrose tritt in der subakuten Phase erst nach ca. 3 Wochen auf. Eine Umwandlung der parenchymatischen Leberzellen im Sinne einer Cirrhose wird in dem 12-wöchigen Beobachtungszeitraum nicht festgestellt.

Nach der Applikation einer einmaligen Dosis von 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁ läßt sich also in den Hepatocyten kein langfristiger hepatocarcinogener Effekt induzieren. Ob sich dagegen aus den Proliferationen von Gallengängen im Gefolge toxischer Parenchymnekrosen nach einmaliger Aflatoxin B₁-Gabe später Cholangiocarcinome entwickeln, kann aus diesen Untersuchungen nicht gefolgert werden. Die weitgehende Reversibilität der morphologischen und histochemischen Veränderungen der Hepatocyten 12 Wochen nach einmaliger Aflatoxin B₁-Gabe beweist, daß diese Veränderungen in direktem Zusammenhang zur akuten Toxizität des Hepatocarcinogens bzw. seiner Derivate stehen.

V. Anhang

Abb. 1



Fig. 2

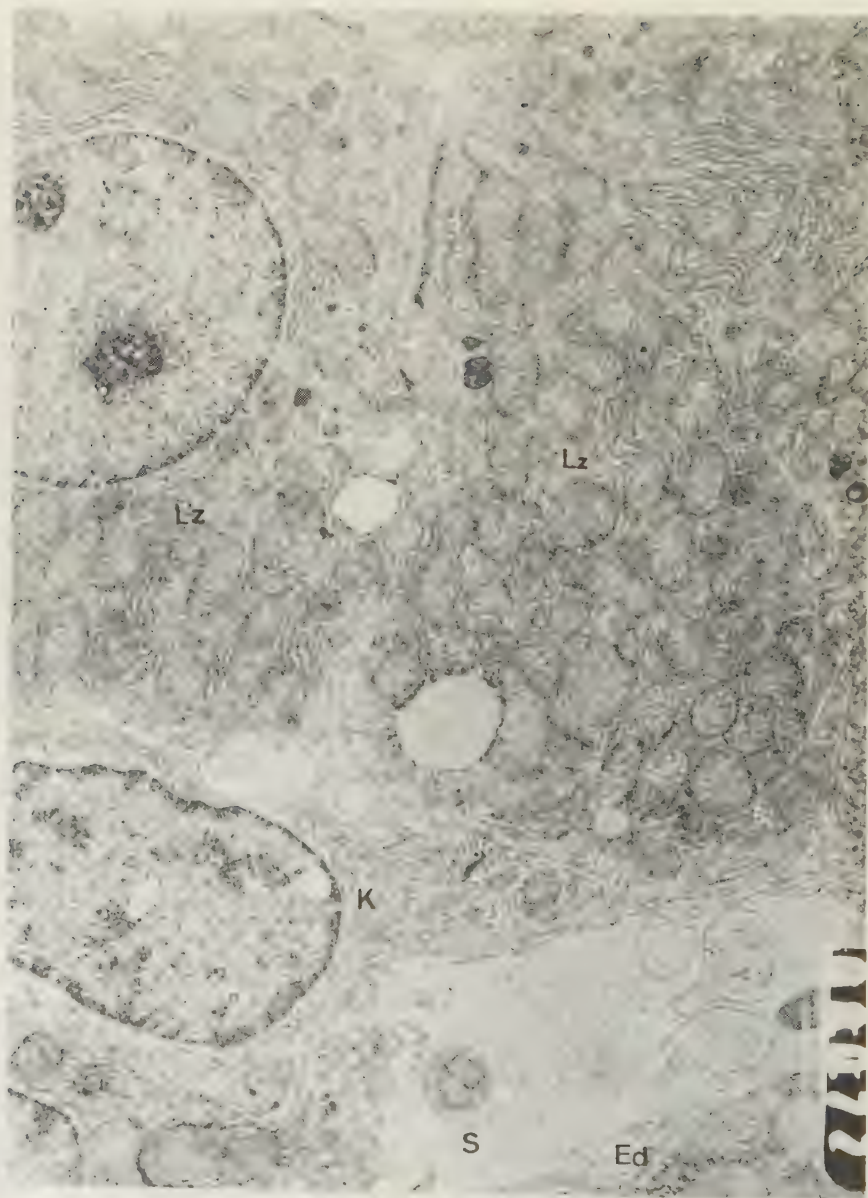


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

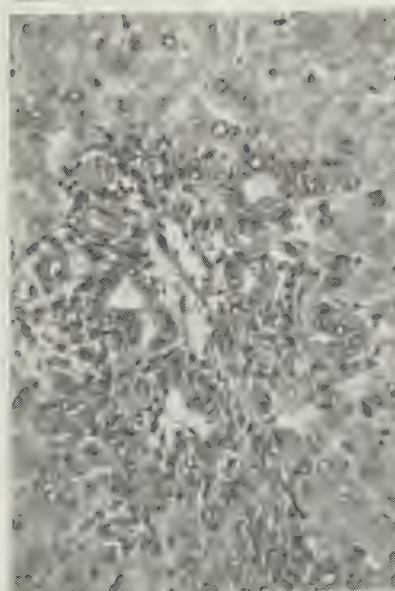
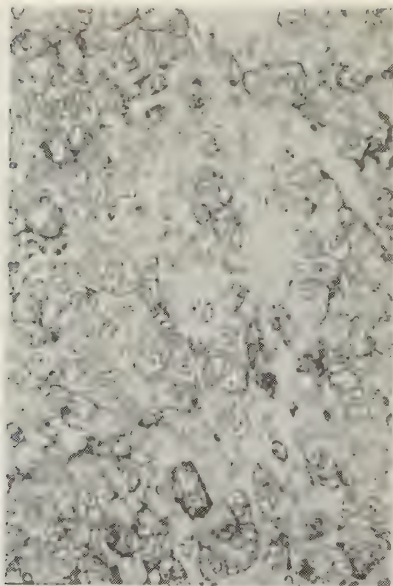


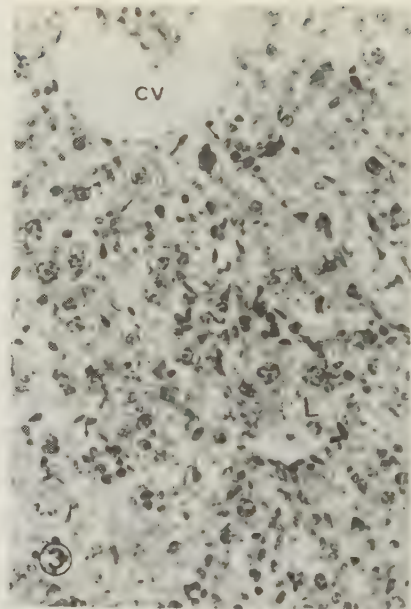
Fig. 6



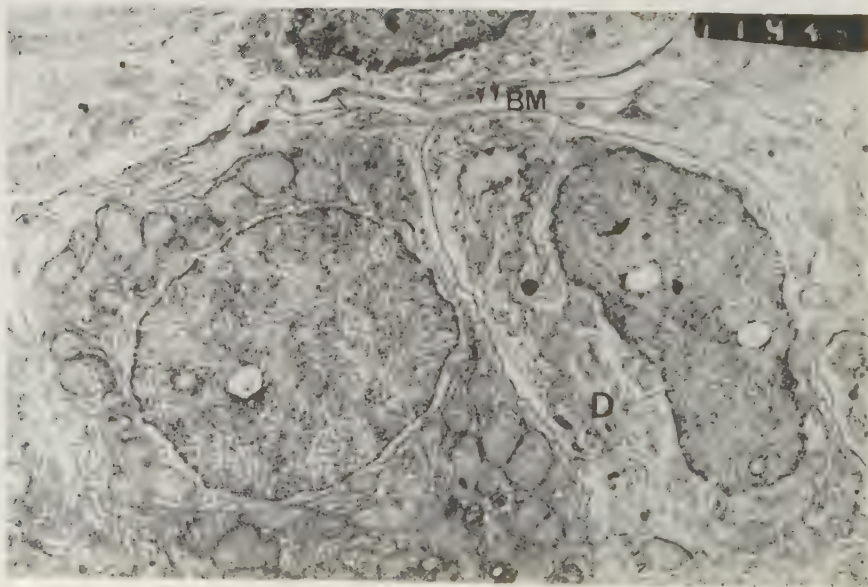
466 2



466 8



466 9



Ann. 10



Abb 11

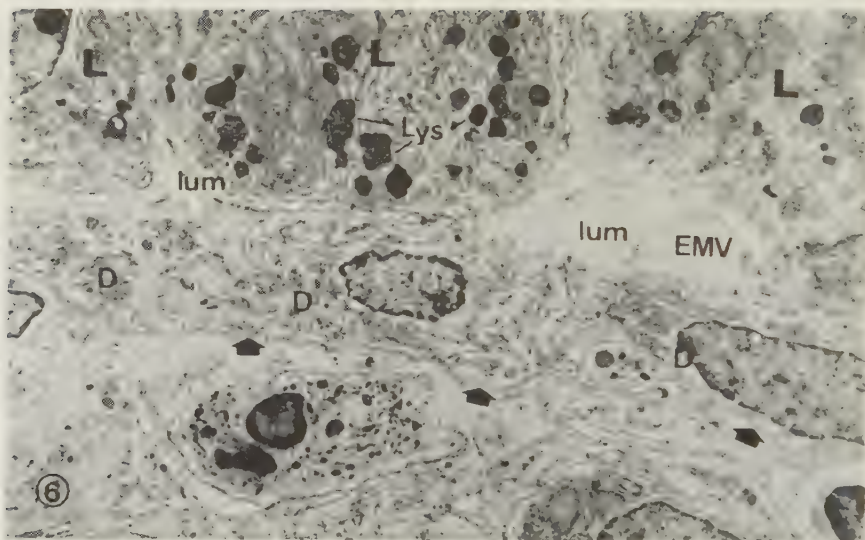


Abb 12

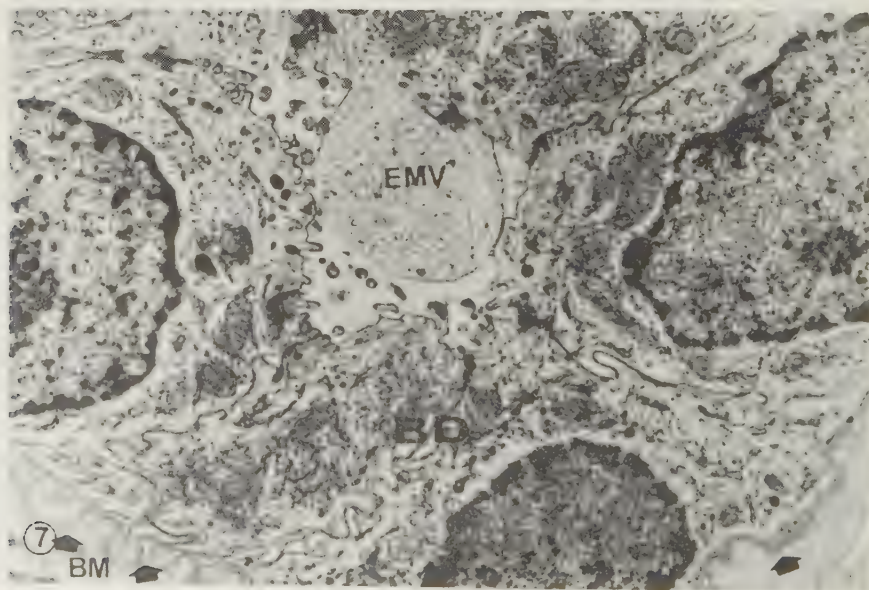


Abb. 13

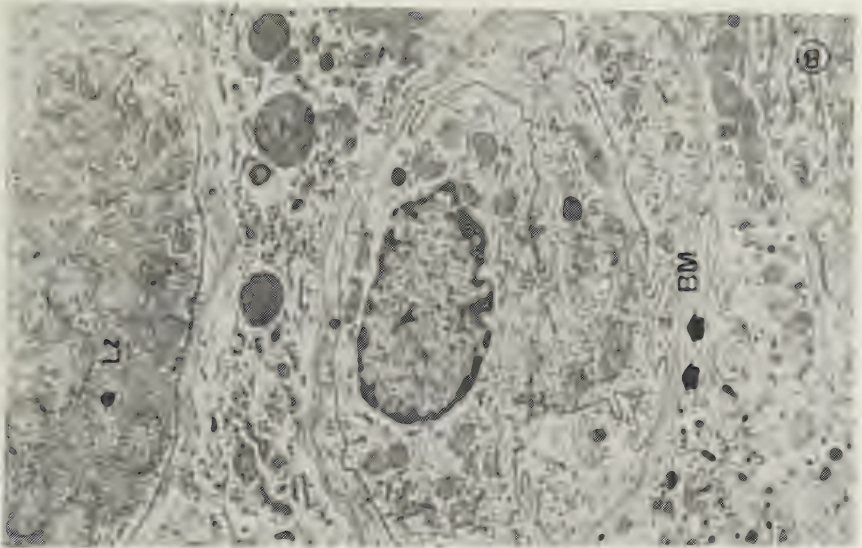


Abb. 14

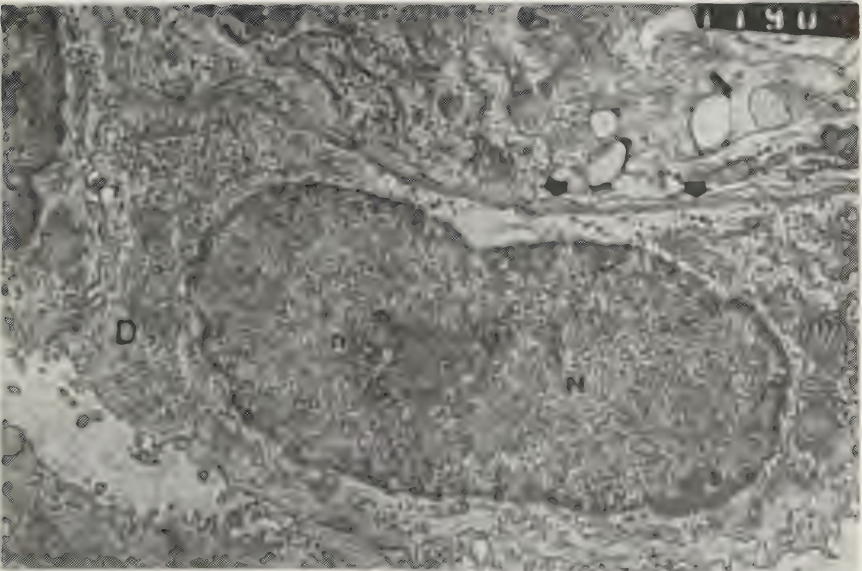


Abb. 15



Abb 16



Abb 17

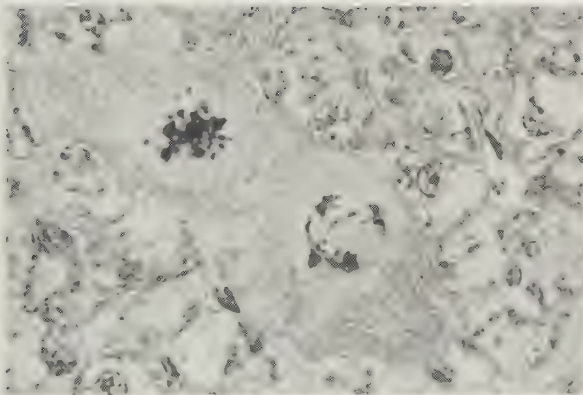


Abb 12

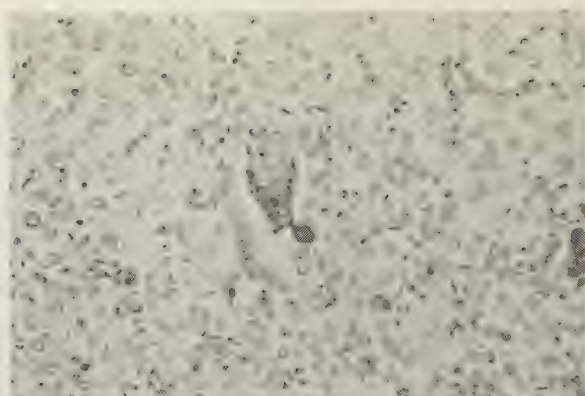
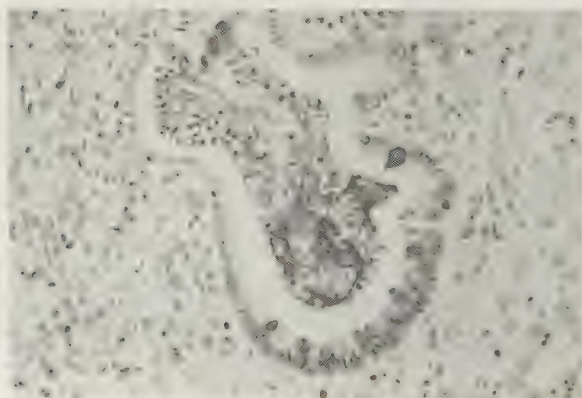


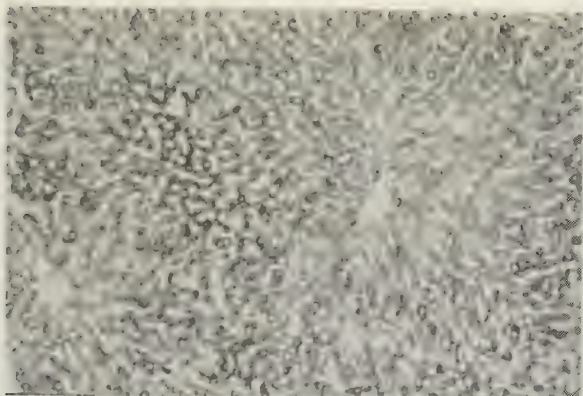
Abb 13



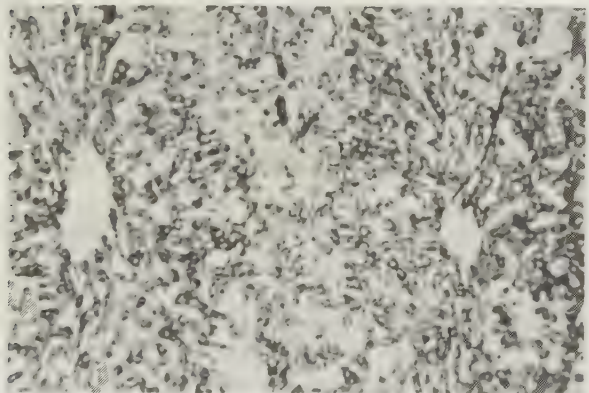
Abb 20



466.21



466.22



466.23

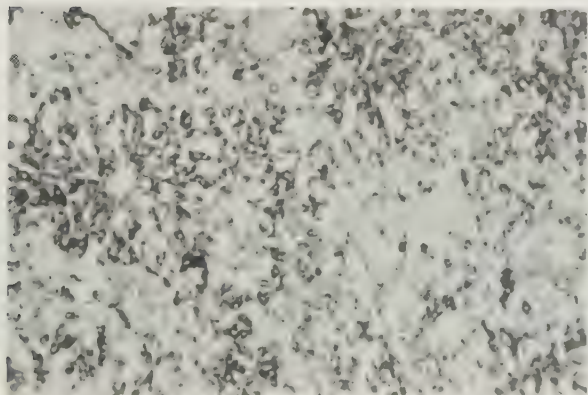


Abb. 24



Abb. 25

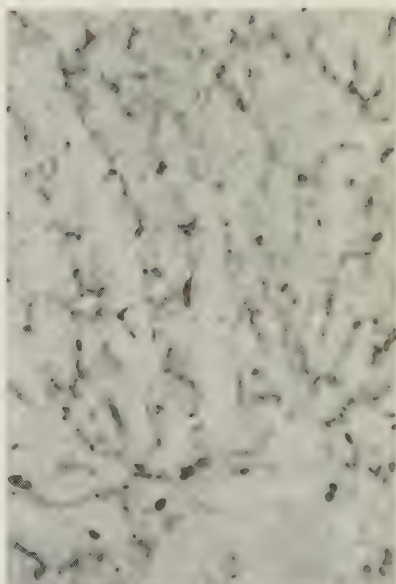


Abb. 26

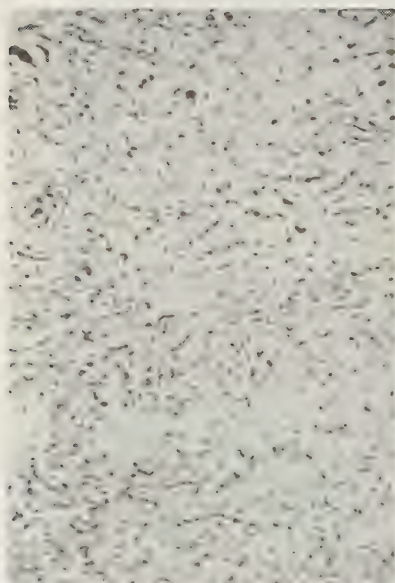
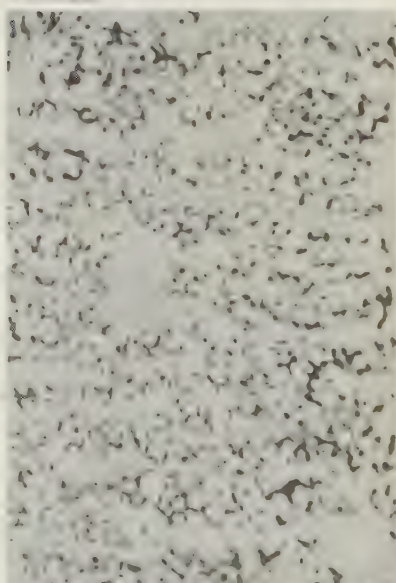
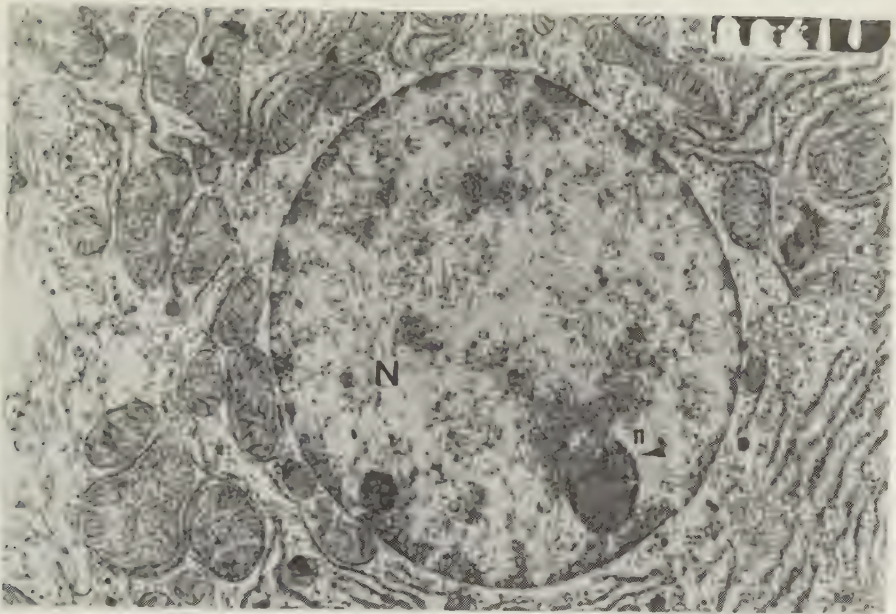


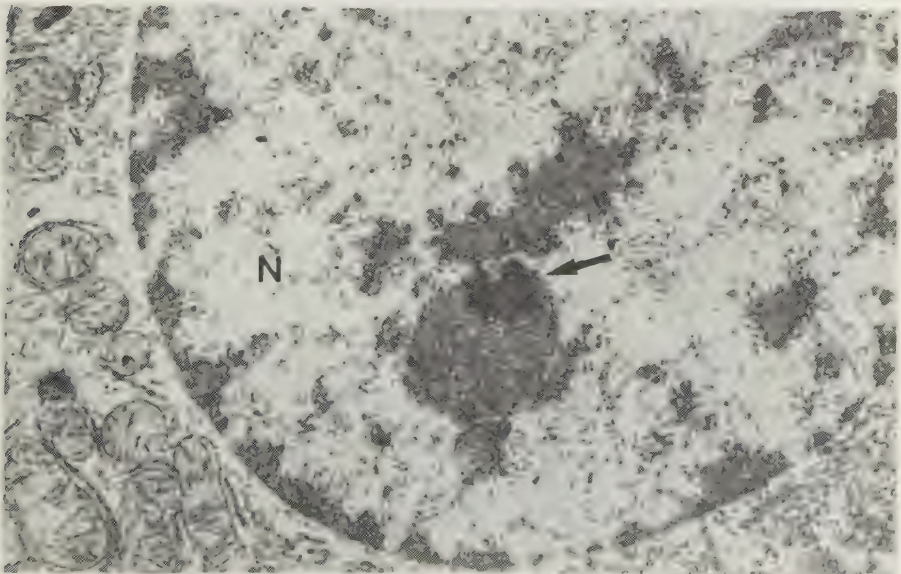
Abb. 27



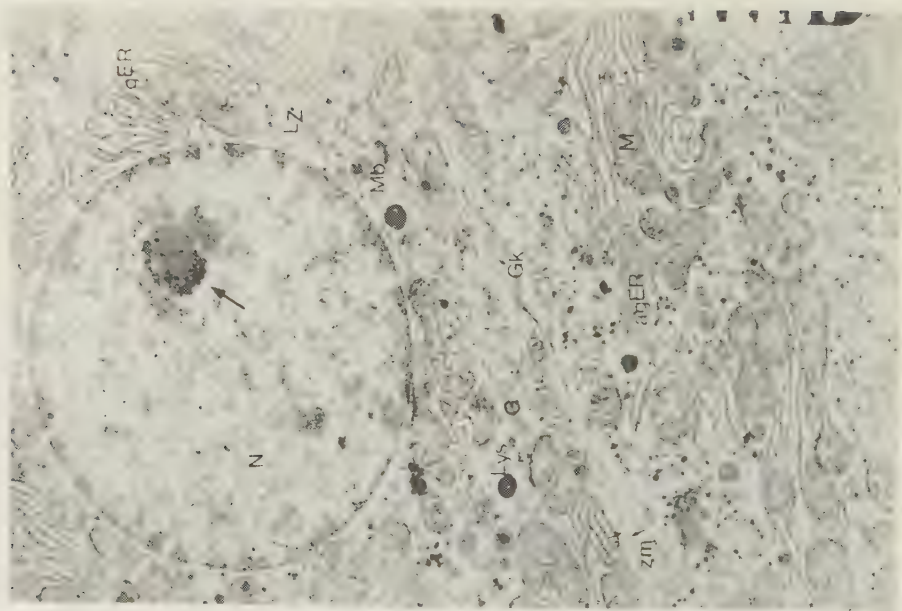
A66.28



A66.29



A66.30



A66.31

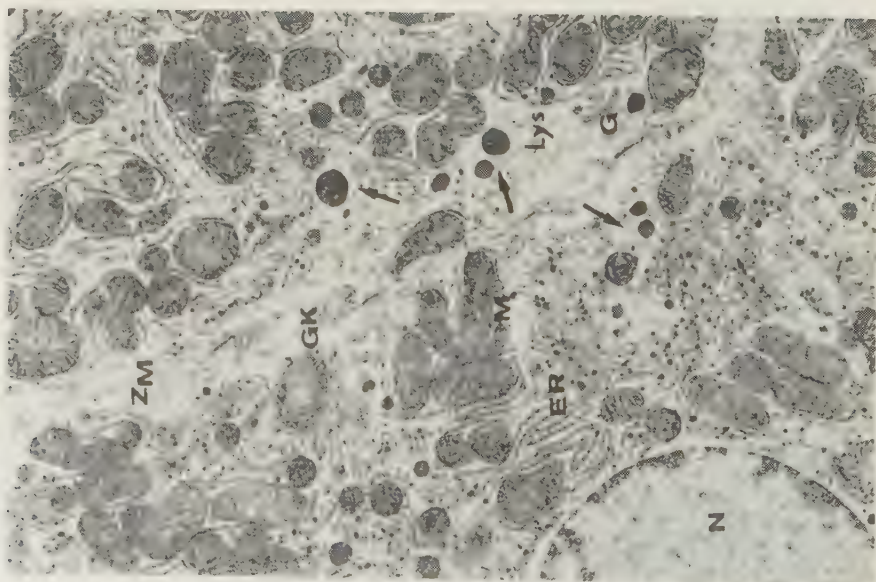


Abb 32

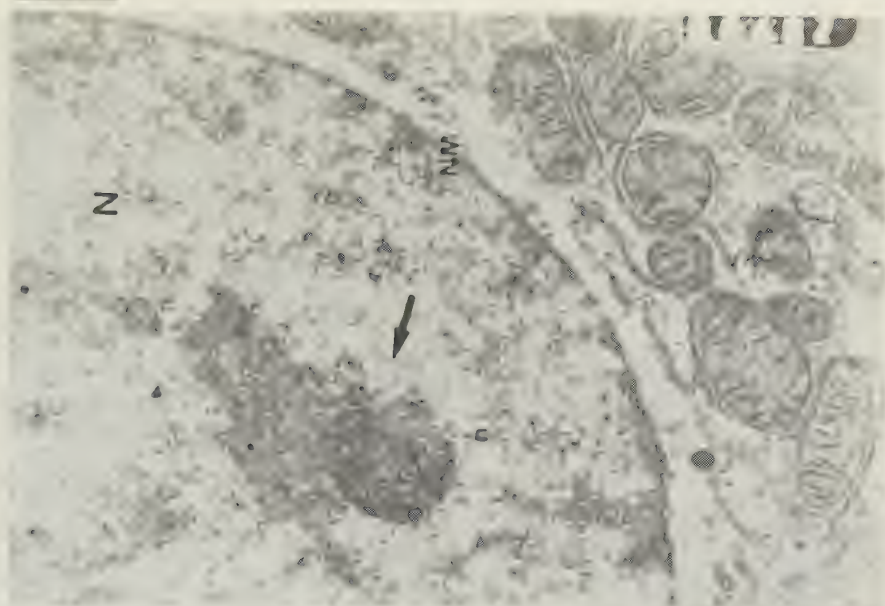
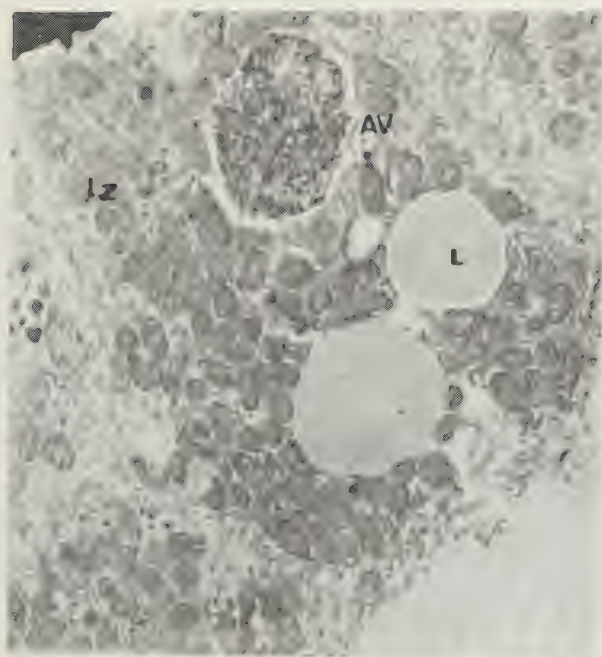
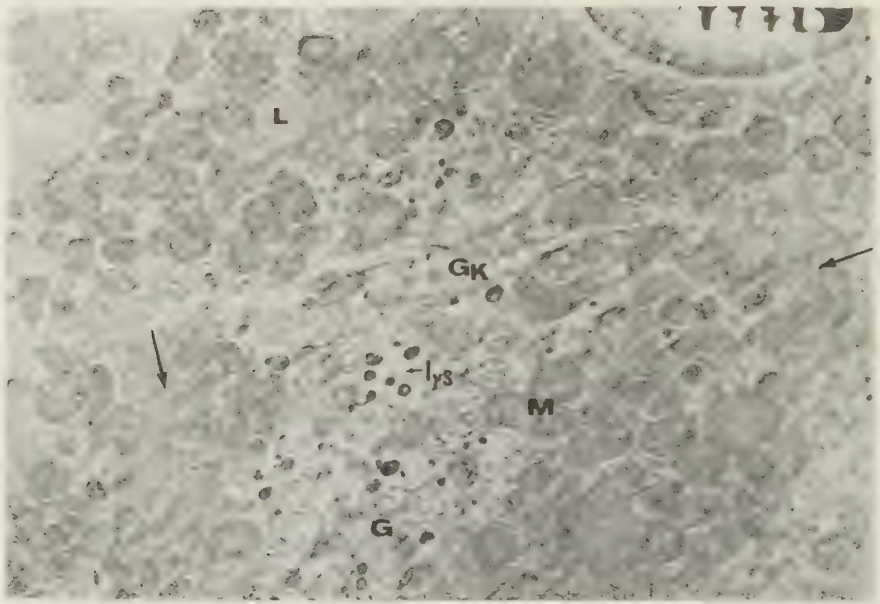


Abb 33



400 34



400 35

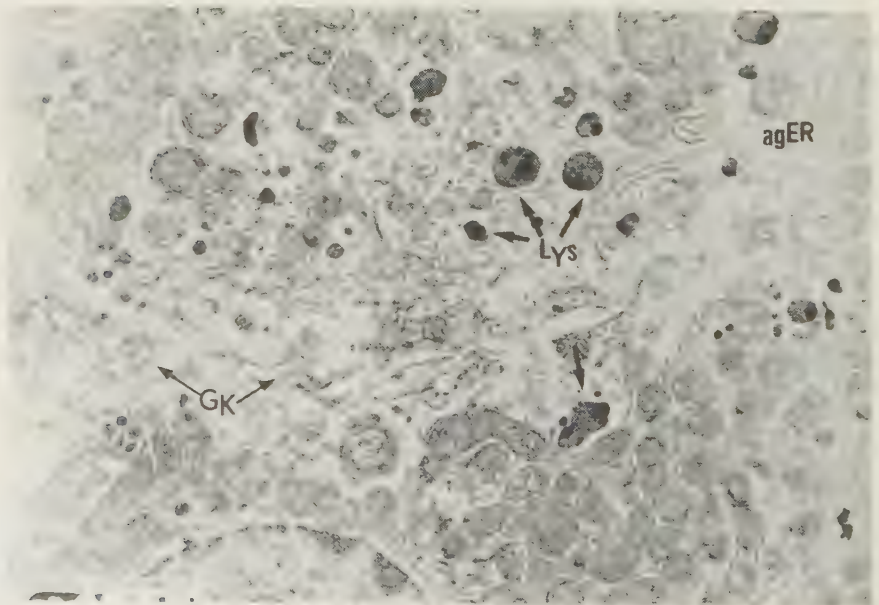


Abb. 36

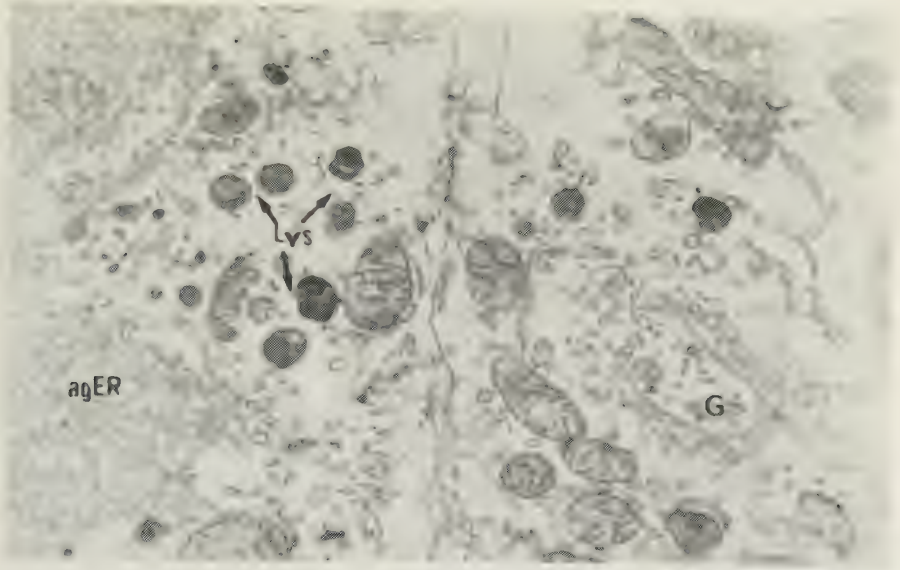


Abb. 37

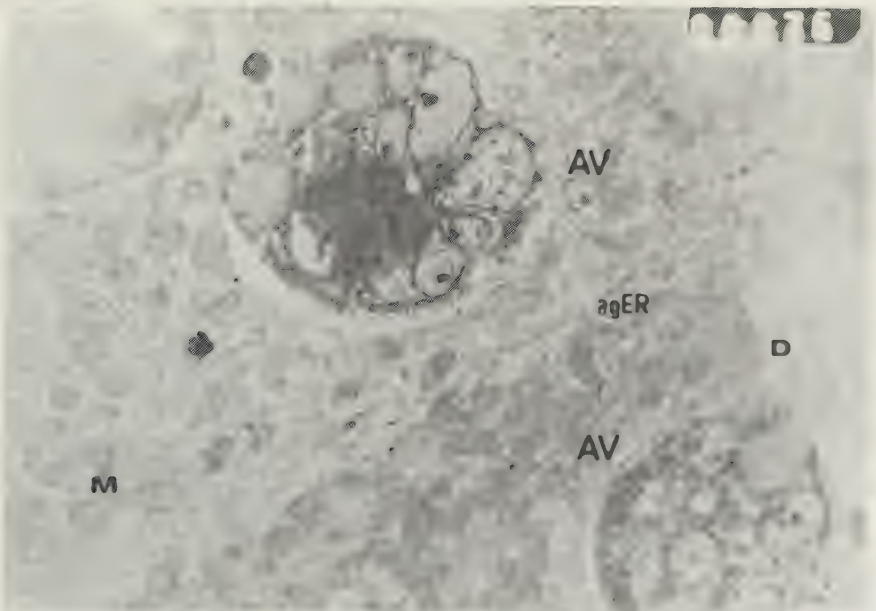


Abb 5E

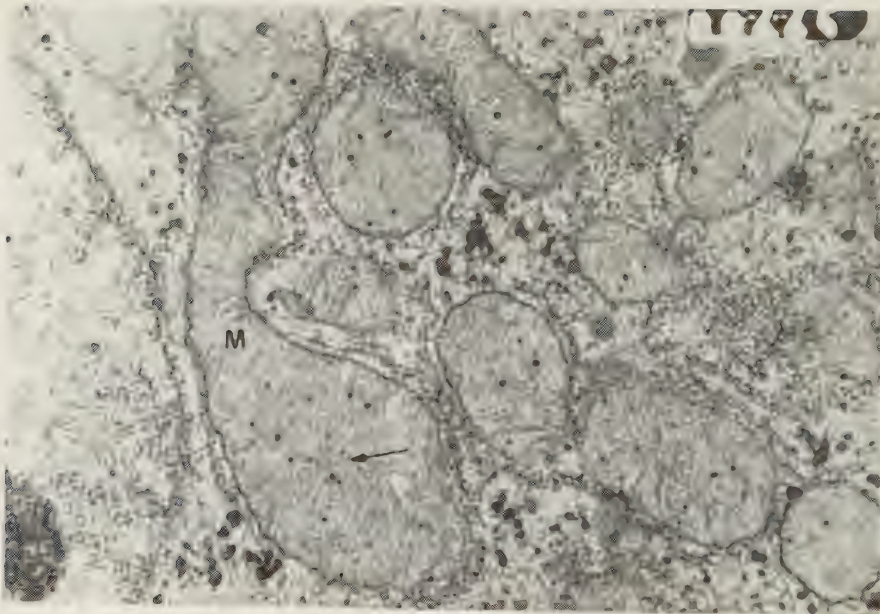


Abb 3E

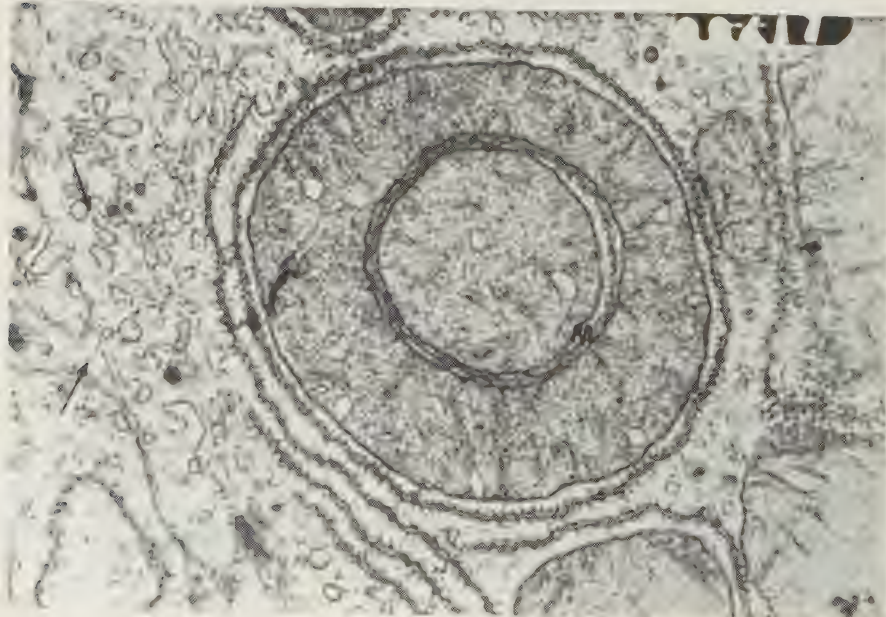


Abb 40

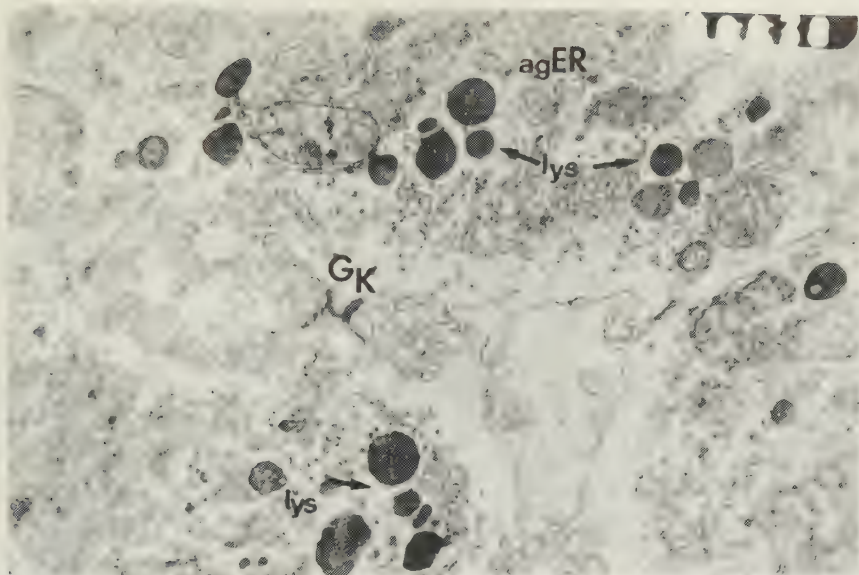


Abb 41

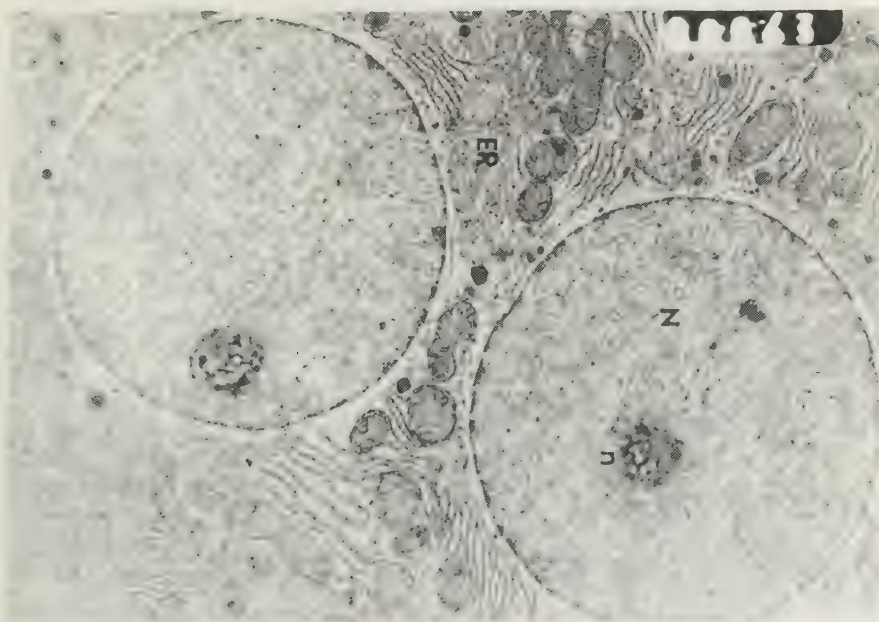


Abb. 42

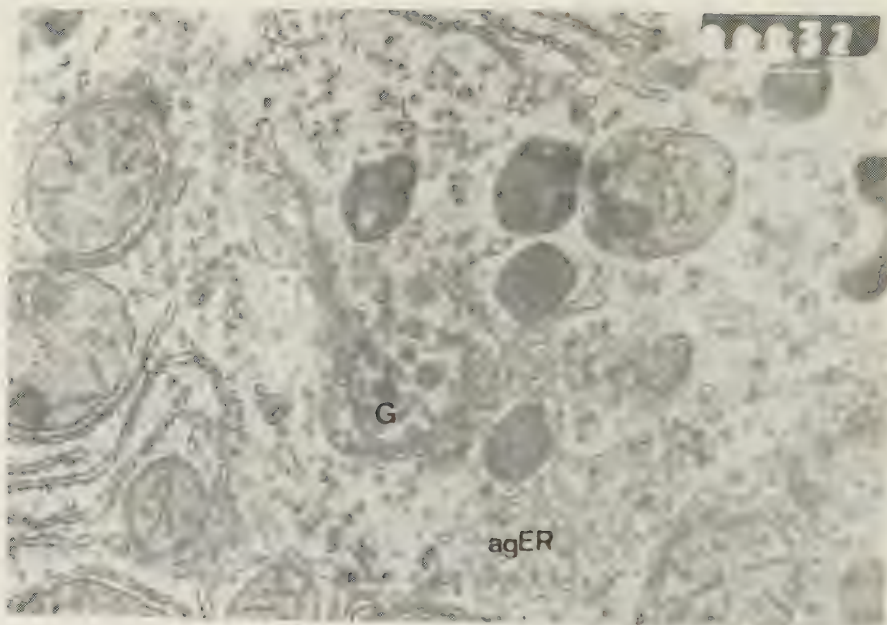


Abb. 43

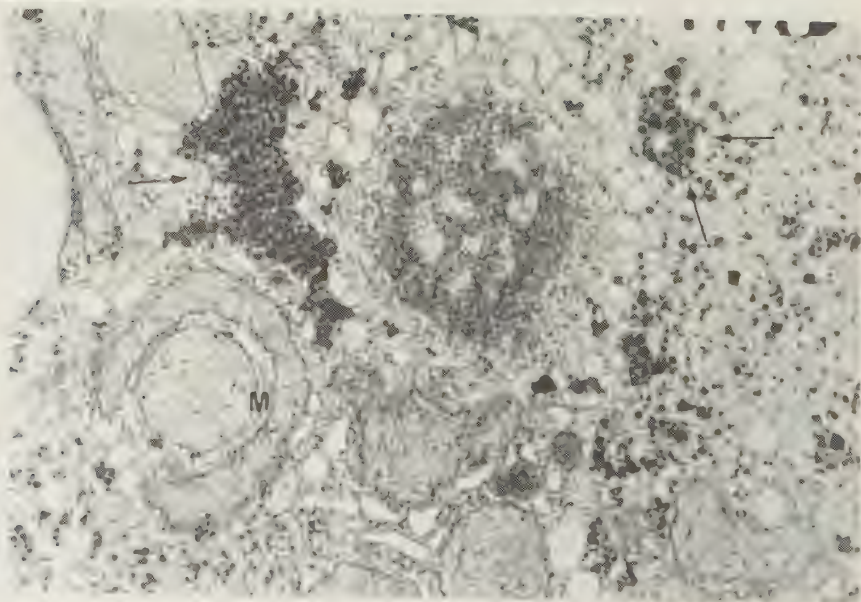


Abb. 44

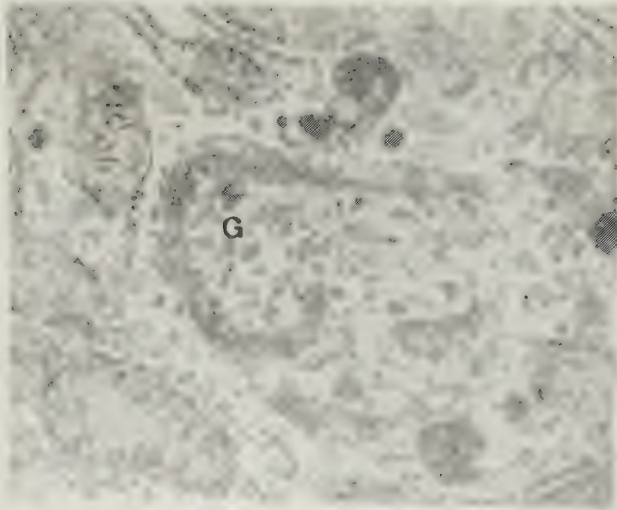
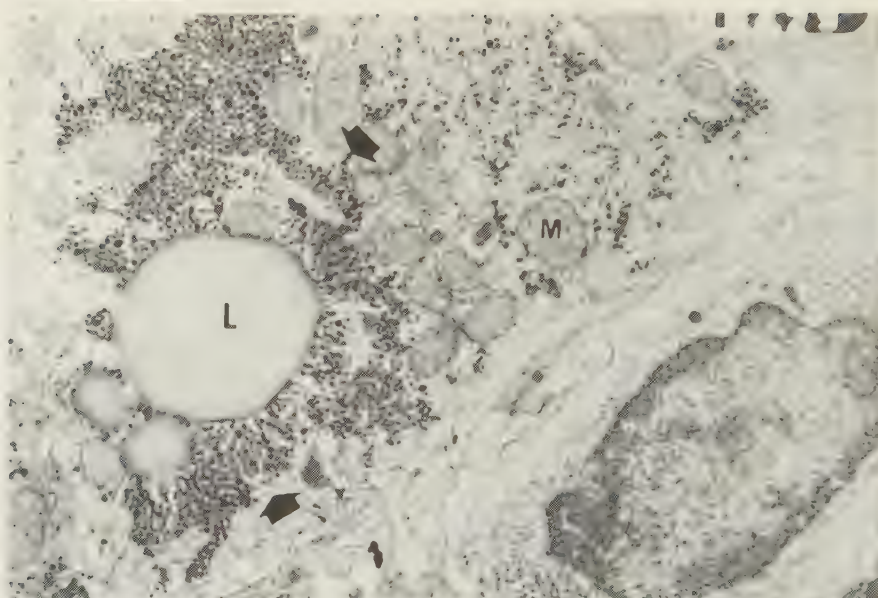


Abb. 45



46646



46647

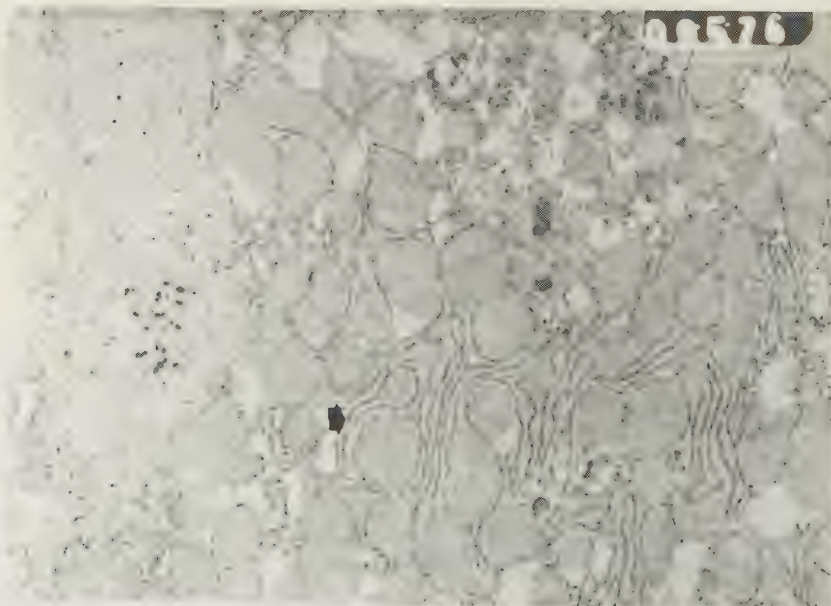


Abb 48

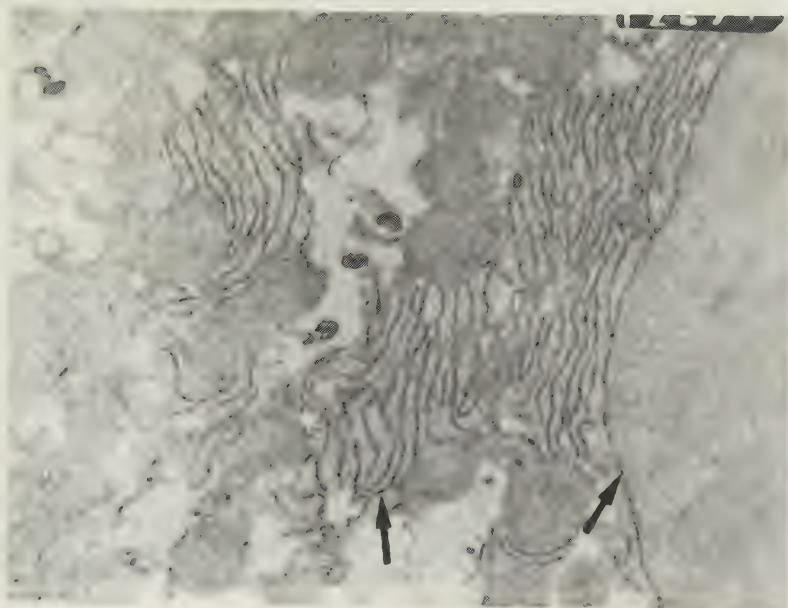
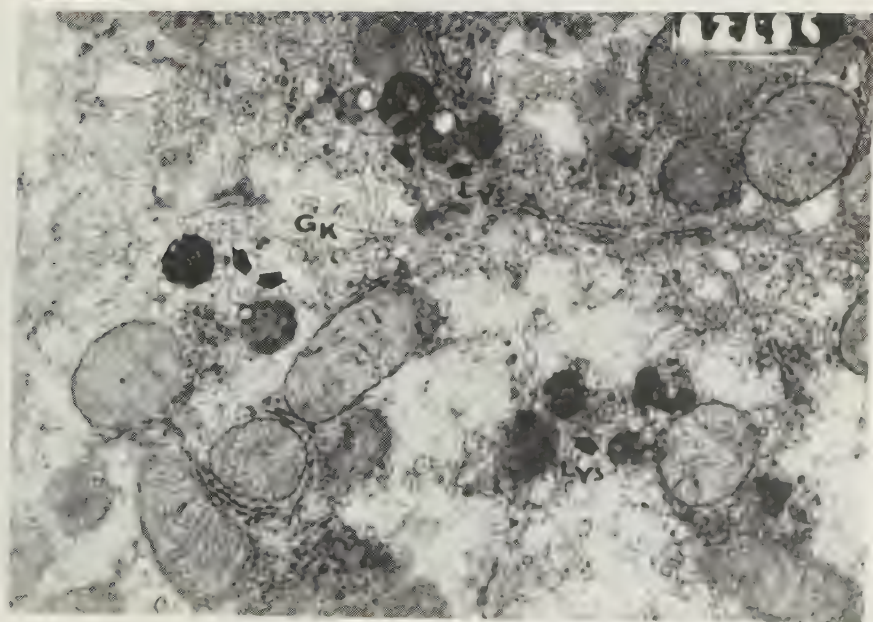
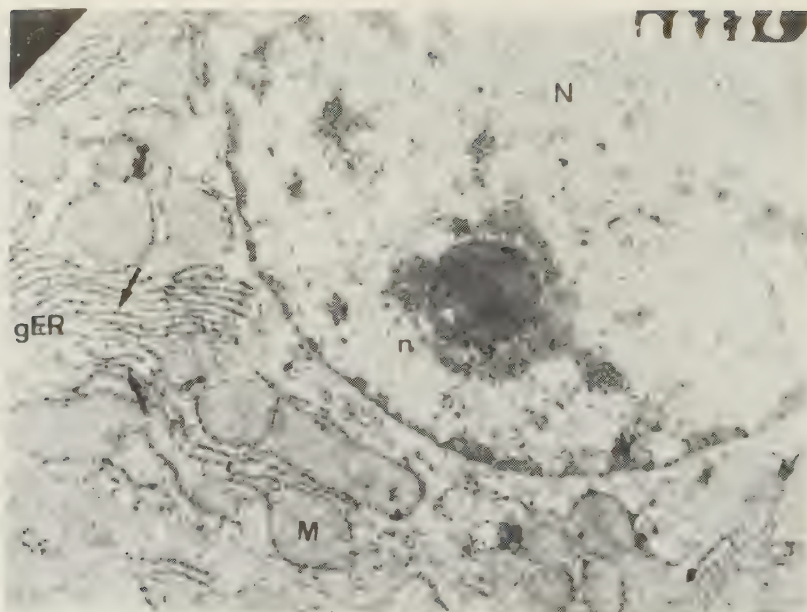


Abb 49



A66.50 (7 std)



A66.51 (7-18 std)

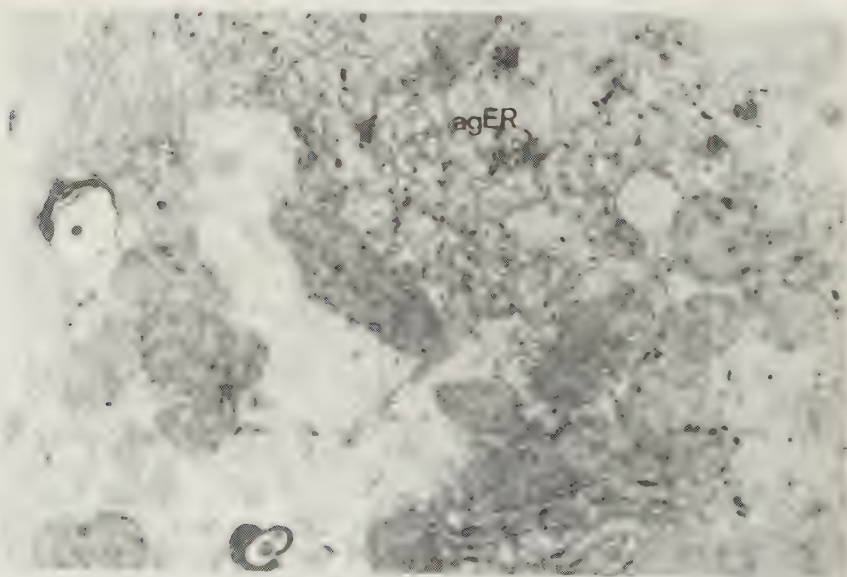


Abb. 52 (24std)

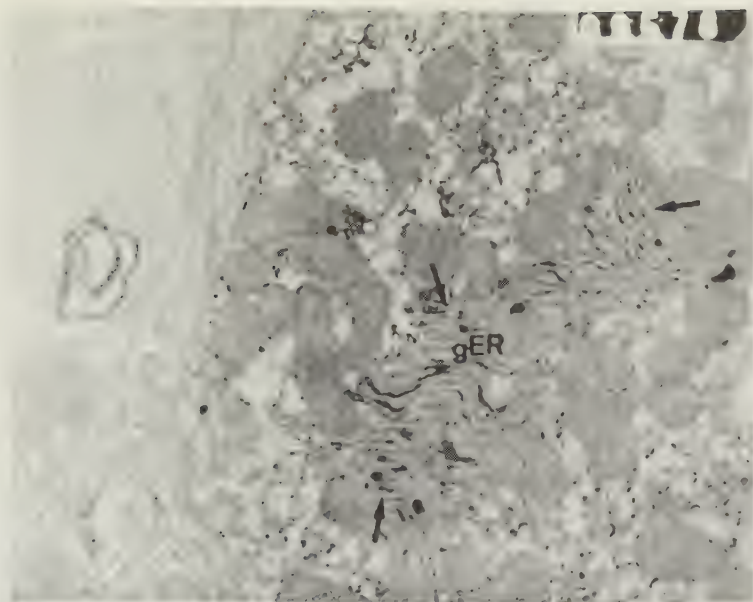


Abb. 53

(78std)

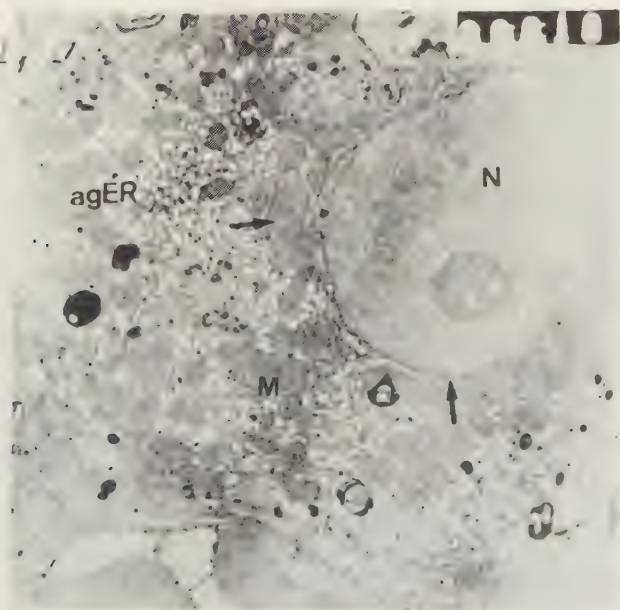


Abb 54

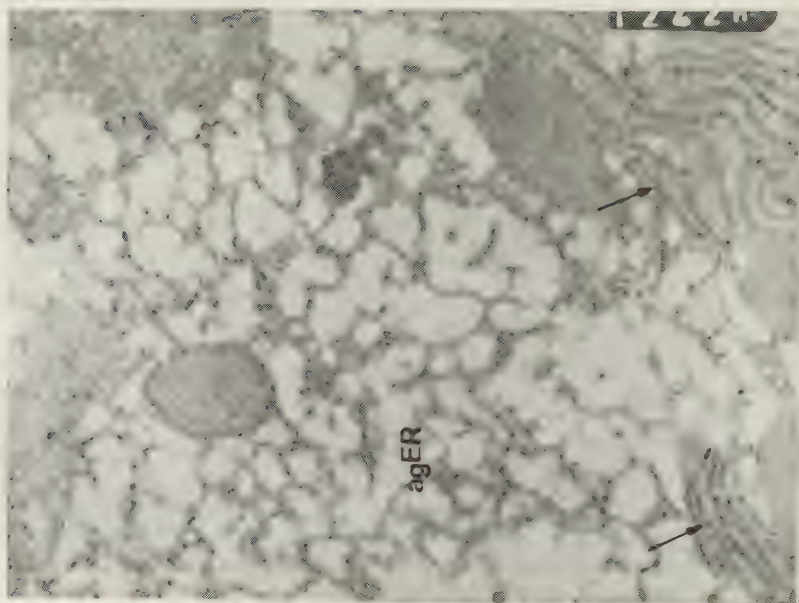


Abb 55

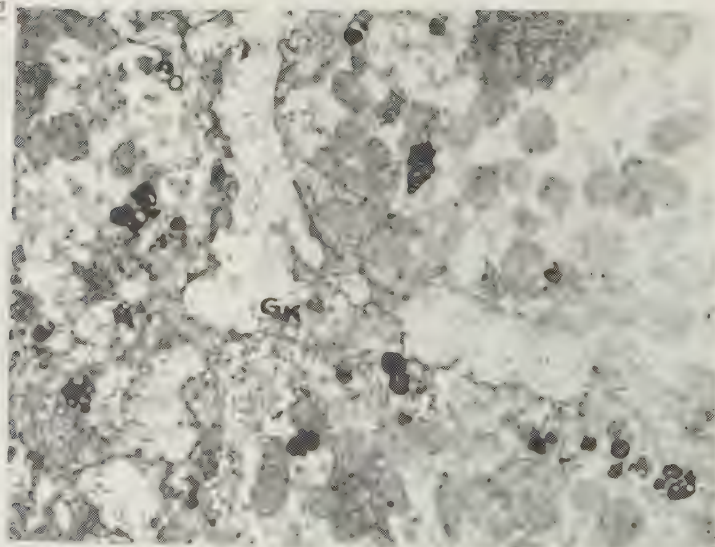


Abb 56

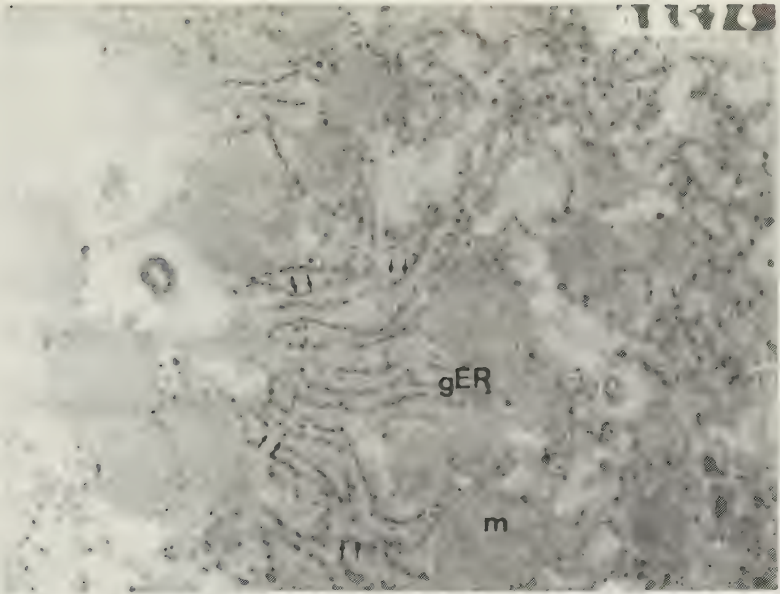
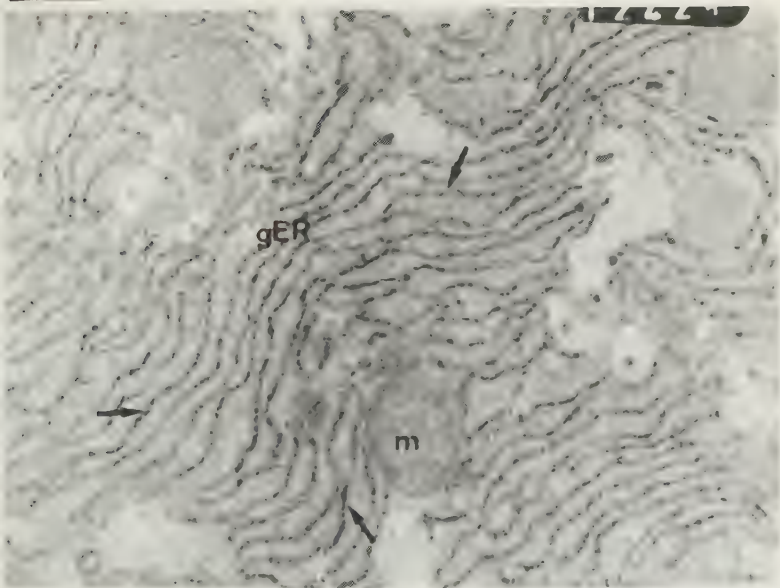
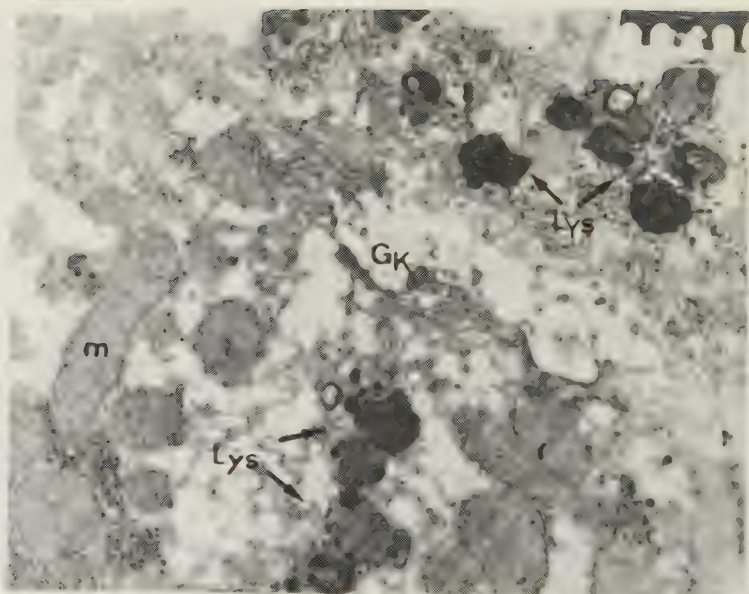


Abb 57



Ala 58



Ala 59

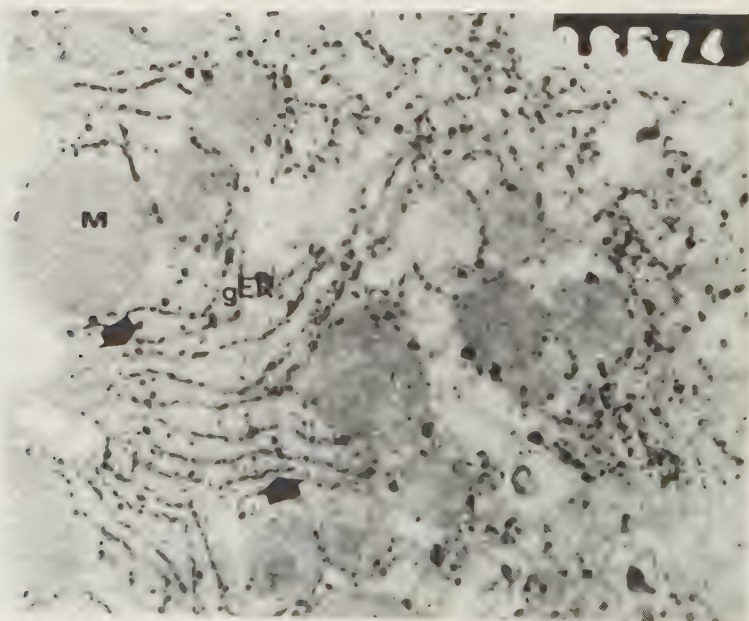


Abb. 60

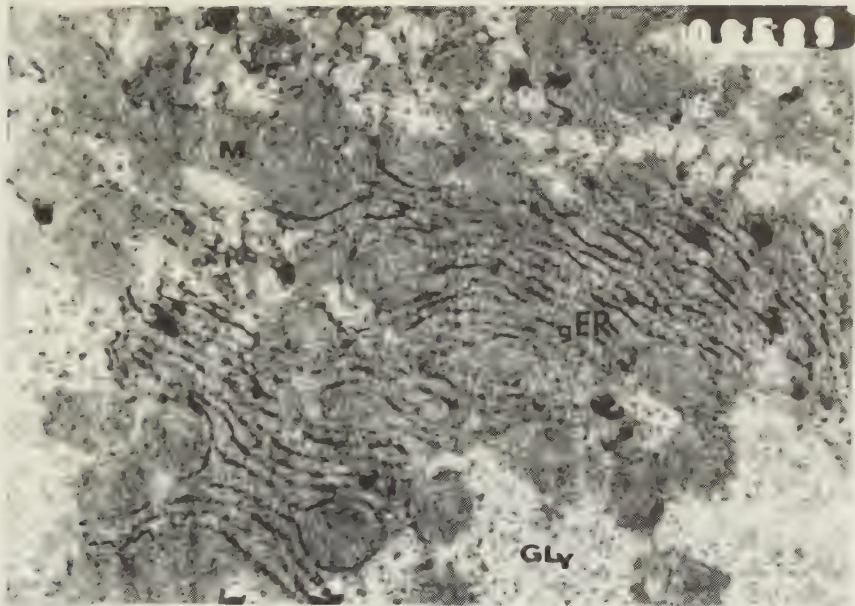
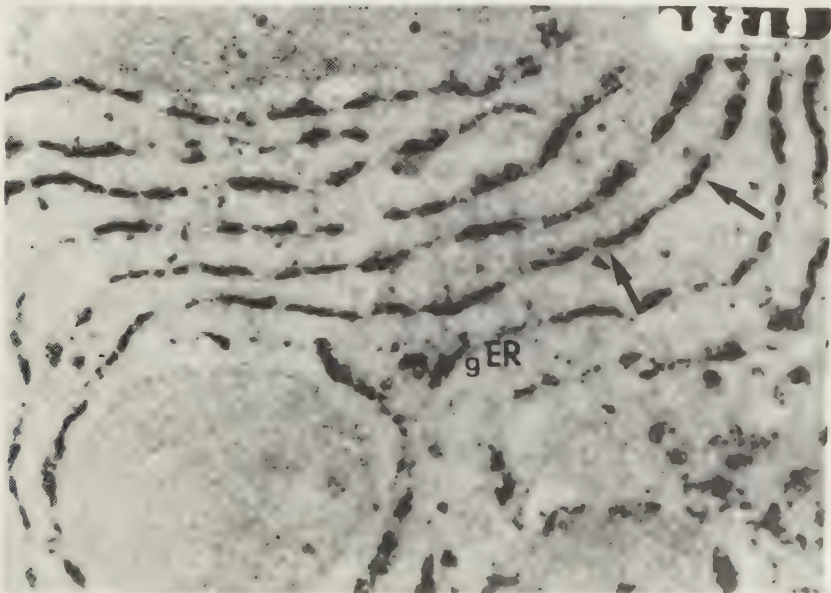


Abb. 61



Legende

AV	= Autophage Vakuole
BM	= Basalmembran
C	= Cristae d. Mitochondrien
D	= Disse'Raum
Db	= Dense body (Telolysosom)
Ed	= Endothelzelle
ER	= Endoplasmatisches Reticulum
agER	= agranuläres ER
gER	= granuläres ER
Ep	= Gallengangsepithelzellen
G	= Golgi-Apparat
g/f	= granuläre/fibrilläre Anteile des Nucleolus
GK	= Gallenkapillare
Gly	= Glycogen
K	= Kupffer'Sternzelle
L	= Lipidtropfen
Lys	= Lysosom
Lum	= Lumen
M	= Mitochondrium
Mb	= Microbody
MV	= Mikrovilli
N	= Nucleus
Nm	= Nuclearmembran
n	= Nucleolus
OMV	= Ödematös aufgetriebene Mikrovilli
Ri	= Ribosomale Partikel
S	= Sinuoid
Sg	= Sekretgranula .
V	= Vakuolen
ZV	= Zentralvene
ZM	= Zentralmembran

- Abb. 1 Rattenleber. Kontrolle. Leberzellen und
Gallenkapillare.
X 12 000
- Abb. 2 Rattenleber. Kontrolle. Leberzelle mit Kupf-
fer'Sternzelle, Endothelzelle und Sinusoid.
X 12 000
- Abb. 3 Rattenleber. Periportalbereich 48, 72 Stunden
nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
Acinoperiphere Parenchymnekrosen.
Formalin, Paraplast, HE-Färbung. Mikro-
photogramm.
- Abb. 4 Rattenleber. Periportalbereich 72 Stunden nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
Parenchymatische Nekrosen und Proliferation
der Gallengangsepithelzellen.
Formalin, Paraplast, HE-Färbung. Mikro-
photogramm.
- Abb. 5 Prominente Wucherungen der interlobulären
Gallengänge und Wucherungen der Ductuli nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Formalin, Para-
plast, HE-Färbung, Mikrophotogramm, 4 + 21 Tage.
- Abb. 6 Rattenleber. Periportalbereich. 5 mg/kg K.G.
Aflatoxin B₁. "Ovalzellen" und gleichzeitige
Infiltration dieser Zellen zwischen den Le-
berzellplatten.
Formalin, Paraplast, Phosphorphenyl-diamid-
Reaktion. Mikrophotogramm.
- Abb. 7 Rattenleber. Periportalbereich. 5 mg/kg K.G.
Aflatoxin B₁. Ovalzellen durchsetzen den ge-
samten Leberlobulus nach 14 Tagen.
Formalin, Paraplast, PAS-Reaktion, Mikro-
photogramm.

- Abb. 8 Rattenleber. Proliferierte Gallengangsepithelzellen bis nahe der Zentralvene. 14 Tage nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Formalin, Paraplast, Mikrophotogramm.
- Abb. 9 Rattenleber. Periportalbereich. Proliferation der Gallengangsepithelzellen.
X 9 000
- Abb. 10 Rattenleber. Periportalbereich. Leberzelle und proliferierte Gallengangsepithelzelle nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. 14 bis 21 Tage. Ähnlichkeit der Ovalzellen mit den Gallengangsepithelzellen.
15 000 .
- Abb. 11 Rattenleber. Periportalbereich. Proliferierte Gallengänge als einreihige Zellplatte an Leberzellen anliegend. Nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. 14 bis 21 Tage.
X 6 000
- Abb. 12 Rattenleber. Periportalbereich. Proliferierte Gallengangsepithelzellen, Lumina mit aufgetriebenen Mikrovilli. 14 bis 21 Tage nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
X 15 000
- Abb. 13 Rattenleber. Periportalbereich. Proliferierte Gallengangsepithelzellen. Verdoppelungen der Basalmembran. Nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
X 12 000
- Abb. 14 Rattenleber. Proliferierte, große Gallengangsepithelzelle mit großem Zellkern und ausgeprägtem Nucleolus. 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
X 12 000

- Abb. 15 Rattenleber. Proliferierte Gallengangsepithelzellen mit großen Zellkernen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
X 8 400
- Abb. 16 Rattenleber. Die proliferierten Gallengangsepithelzellen durchsetzen die Leberlobuli. 4 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Formalin, Paraplast, HE-Färbung, Mikrophotogramm.
- Abb. 17 Rattenleber. Pathologische Mitosen der Leberzelle. 4 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Formalin, Paraplast, HE-Färbung, Mikrophotogramm.
- Abb. 18 Rattenleber. Proliferierte Gallengänge. PAS-Reaktion. Der PAS-positive cytoplasmatische Inhalt wird häufig in die Lichtung der proliferierten Gallengänge sezerniert. 8/9 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Formalin, Paraplast, PAS-Färbung, Mikrophotogramm.
- Abb. 19 Rattenleber. Proliferierte Gallengänge, osmiophile Sekretgranulaanhäufungen. 8/9 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁.
X 5 000
- Abb. 20 Rattenleber. Proliferierte Gallengänge im Portalfeld. Mucopolysaccharidspeichernde Zellen. PAS-positive Reaktion. 10/11/12 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Formalin, Paraplast, PAS-Färbung, Mikrophotogramm.

- Abb. 21 Rattenleber. Kontrolle. Leberzellen. Gleichmäßige Verteilung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität. Reaktionen in peripheren Bereichen des Lobulus stärker als in zentralen. Perfusionsfixation. Kryostatschnitt. Inkubationszeit 15 min. Glucose-6-Phosphatase Darstellung nach WACHSTEIN und MEISEL, LAZARUS und BARDEN und HUGON et al. Mikrophotogramm.
- Abb. 22 Rattenleber. Leberzellen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Akute Phase. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Deutliche Verminderung der Enzymaktivität. Mikrophotogramm.
- Abb. 23 Rattenleber. Leberzellen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Akute Phase. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Verminderung der Enzymaktivität in periportalen Bereichen ausgeprägter als in zentrolobulären. Mikrophotogramm.
- Abb. 24/25 Rattenleber. Kontrolle. Leberzellen. Pericaniculäre Lokalisation der Sauren Phosphatase in den Lysosomen. Perfusionsfixation. Kryostatschnitt. Inkubationszeit 30 min. Saure Phosphatase Darstellung nach GOMORI. Ammoniumsulfid. Mikrophotogramm.
- Abb. 26 Rattenleber. Leberzellen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Akute Phase. Saure Phosphatase Darstellung. Enzymaktivität im peribiliären Bereich leicht vermehrt. Mikrophotogramm.
- Abb. 27 Rattenleber. Leberzellen. Saure Phosphatase Darstellung 4 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Enzymreaktion verstärkt, Mikrophotogramm.

- Abb. 28 Rattenleber. Leberzellen. 6/7 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Verdichtungen der nucleolären Strukturen und Segregation der fibrillären und granulären Anteile des Nucleolus. Perfusionsfixation mit Glutaraldehyd. Postfixation in OsO₄. Durcupan ACM. X 13 500.
- Abb. 29 Rattenleber. Leberzelle. 72 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Deutliche "Nucleolenkappenbildung". X 21 600.
- Abb. 30 Rattenleber. Periportalbereich. Leberzellen. Cytoplasma der Leberzelle 7 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Proliferation des agranulären ER und Verminderung von Glycogengranula.
- Abb. 31 Rattenleber. Periportalbereich. Leberzelle. Cytoplasma der Leberzelle 7 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Leichte Vermehrung der pericaniculär gelegenen Lysosomen. X 12 100
- Abb. 32 Rattenleber. Periportalbereich. Leberzelle. 18 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Zellkern mit irregulärem Nucleolus. X 21 600
- Abb. 33 Rattenleber. Periportalbereich. Leberzelle. Cytoplasma 18 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Große autophage Vakuolen. X 7 500

- Abb. 34 Rattenleber. Periportalbereich. Cytoplasma der Leberzelle 24 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Ausgeprägte Proliferation des agranulären ER und deutliche Verminderung des Glycogengehaltes.
X 10 000
- Abb. 35 Rattenleber. Periportalbereich. Cytoplasma der Leberzellen 24 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Gallenkapillaren mit Mikrovilli-abflachung und Zottenschwellung. Proliferation des agranulären ER und Lysosomenvermehrung.
X 13 500
- Abb. 36 Rattenleber. Leberzellen. 72 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Ausgeprägte Proliferation des agranulären ER und Dilatation des Golgi-Apparates.
X 21 600
- Abb. 37 Rattenleber. Periportalbereich. Cytoplasma der Leberzellen 48 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Vermehrtes Auftreten autophager Vakuolen.
X 11 300
- Abb. 38 Rattenleber. Leberzelle. 72 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Alterationen der Mitochondrien persistieren.
X 35 000
- Abb. 39 Rattenleber. Leberzelle. 72 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Alteration der Mitochondrien. Ringförmige Strukturen umgeben von granulärem ER und proliferiertem agranulärem ER.
X 45 000

- Abb. 40 Rattenleber. Leberzellen. 96 Stunden nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Gallenkapillaren
mit Mikrovilli.
X 20 000
- Abb. 41 Rattenleber. Leberzellen. 2 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Zellkern und
Nucleolus normal. Agranuläres ER proliferiert.
X 17 500
- Abb. 42 Rattenleber. Leberzelle. 2 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Proliferation
des agranulären ER und Dilatation des Golgi-
Apparates.
X 37 500
- Abb. 43 Rattenleber. Leberzellen. 2 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glycogen wieder
vorhanden. Mitochondrien alteriert.
X 25 000
- Abb. 44 Rattenleber. Leberzelle. 3 und 4 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Dilatation der
Golgi-Cisternen.
X 25 000
- Abb. 45 Rattenleber. Leberzelle. 3 und 4 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Ausgeprägte Proli-
feration des agranulären ER.
X 24 000
- Abb. 46 Rattenleber. Leberzellen. 3 und 4 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Starke Glycogen-
anhäufung und -komprimierung.
X 15 000

- Abb. 47 Rattenleber. Kontrolle. Leberzelle. Gleichmäßige Verteilung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität. Lokalisation am Membransystem des granulären ER. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 18 000
- Abb. 48 Rattenleber. Kontrolle. Leberzelle. Glucose-6-Phosphatase Darstellung am Membransystem des granulären ER und an der äußeren Kernmembran. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 33 000
- Abb. 49 Rattenleber. Kontrolle. Leberzelle. Saure Phosphatase Darstellung in den Lysosomen nahe der Gallenkapillaren. Kontrastierung. Durcupan ACM. X 13 000
- Abb. 50 Rattenleber. Leberzelle. 7 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Verminderte Enzymreaktion im periportalen Bereich. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 22 400
- Abb. 51 Rattenleber. Leberzelle. 7 bis 18 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Verminderte Enzymreaktion und Proliferation des agranulären ER. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 25 200
- Abb. 52 Rattenleber. Leberzelle. 24 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Deutlich verminderte Enzymreaktion. Lokalisation am granulären ER. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 18 000

- Abb. 53 Rattenleber. Leberzelle. 48 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Enzymreaktion deutlich abgeschwächt. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 6 000
- Abb. 54 Rattenleber. Leberzelle. 48 bis 96 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Enzymreaktion deutlich vermindert. Proliferation des agranulären ER. Unkontrastiert. Durcupan ACM. X 45 000
- Abb. 55 Rattenleber. Leberzelle. 48 bis 96 Stunden nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Saure Phosphatase Darstellung. Vermehrte Enzymreaktion und vermehrte Lysosomenzahl. Kontrastiert. Durcupan ACM. X 12 500
- Abb. 56/57 Rattenleber. Leberzelle. 2 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phosphatase Darstellung. Deutliche Enzymreaktion am granulären ER. Unkontrastiert. Durcupan ACM.
X 30 000 (Abb. 56)
X 40 000 (Abb. 57)
- Abb. 58 Rattenleber. Leberzelle. 2 Wochen nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Saure Phosphatase Darstellung. Enzymreaktion gegenüber Kontrolle verstärkt. Kontrastierung. Durcupan ACM. X 20 000

- Abb. 59 Rattenleber. Leberzelle. 4 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phos-
phatase Darstellung. Deutliche Enzymreaktion
am granulären ER. Unkontrastiert, Durcupan
ACM.
X 35 000
- Abb. 60 Rattenleber. Leberzelle. 4 Wochen nach
5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-Phos-
phatase Darstellung. Deutliche Enzymreaktion
am granulären ER und Glycogengranula. Kon-
trastierung. Durcupan ACM.
X 25 000
- Abb. 61 Rattenleber. Leberzelle. 10 und 12 Wochen
nach 5 mg/kg K.G. Aflatoxin B₁. Glucose-6-
Phosphatase Darstellung. Ausgeprägte Enzym-
Reaktion an den Membranen des granulären ER.
Unkontrastiert. Durcupan ACM.
X 200 000.

Lebenslauf

Am 7. Dezember 1947 wurde ich, Bernd Waldemar Konrad Nussinger als Sohn des Rentners Alfred Nussinger und seiner Ehefrau Lisa geb. Oehm in Weitramsdorf Kreis Coburg geboren.

Von September 1954 bis Juli 1958 besuchte ich die Volksschule in Weitramsdorf. Im September 1958 trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Ernestinum in Coburg ein, wo ich im Juni 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1967 bis April 1969 leistete ich meinen Militärdienst ab.

Im Sommersemester 1969 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Fächer Sport und Biologie sowie des Erweiterungsfaches Chemie. Im Frühjahr 1973 legte ich dort die wissenschaftliche Prüfung für das Höhere Lehramt an den Gymnasien in den Fächern Sport und Biologie ab. Im September 1973 begann ich die Referendarausbildung am Pädagogischen Seminar des Willstätter Gymnasiums in Nürnberg, in deren Verlauf ich die Zusatzprüfung in Physik ablegte.

Nach der Pädagogischen Prüfung im Juni 1975 trat ich im September 1975 meine jetzige Stelle als Studienrat z.A. für Sport, Biologie und Physik am Pirckheimer Gymnasium in Nürnberg an.

Bernd Nussinger

Copy-Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197